



**Manuel Maria Vaz Pequito Mira**

Licenciatura em Geografia

## **Produção de biohidrogénio a partir de diferentes fontes de carbono, por fermentação anaeróbia**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
Energia e Bioenergia.

Orientadora: Doutora, Paula Soares Marques, Investigadora Auxiliar, LNEG  
Co-orientador: Prof. Doutor, Nuno Lapa, Professor Auxiliar, UNL-FCT

Júri:

Presidente: Professora Doutora Benilde Mendes (UNL-FCT-DCTB)  
Arguente: Professora Doutora Ana Fernando (UNL-FCT-DCTB)  
Vogal: Doutora Paula Marques (LNEG-UB)  
Vogal: Professor Doutor Nuno Lapa (UNL-FCT-DCTB)



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2012**



**Título:** Produção de biohidrogénio a partir de diferentes fontes de carbono, por fermentação anaeróbia

**Autor:** Manuel Maria Vaz Pequito Mira

**Contacto do Autor:** manuel\_mira@yahoo.com

O conteúdo da presente dissertação é da inteira responsabilidade do autor.

Não é autorizada a cópia, total ou parcial, do conteúdo da presente dissertação.

É autorizada a citação do conteúdo da presente dissertação, desde que acompanhada da respectiva referência bibliográfica, de acordo com as normas internacionais de citação de trabalhos científicos. “*Copyright*”

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.



## **Agradecimentos**

A dissertação de mestrado representa o culminar de uma longa viagem, que não poderia ser realizada sem o apoio de muitas pessoas.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos à Doutora Paula Marques, minha orientadora, pelo seu excelente apoio, disponibilidade, dedicação, ensinamento e acima de tudo uma grande paciência, ao qual foi fundamental para a realização desta dissertação.

Em seguida agradeço ao Professor Doutor Nuno Lapa, meu co-orientador, pelo incentivo.

Também gostaria de agradecer à Doutora Luísa Gouveia, Doutora Cristina Justino, Doutora Paula Passarinho, Graça Conceição e Natércia Santos pela simpatia e total disponibilidade no apoio em laboratório e na prestação de ensinamentos, que tanto contribuíram para a realização desta dissertação.

Aos meus colegas estagiários e bolseiros que proporcionaram uma boa convivência e inter-ajuda durante o estagio no LNEG, os meus sinceros agradecimentos.

Quero agradecer aos meus Pais e irmão, pelo seu apoio incondicional a todos os níveis e em todos os momentos do meu percurso académico. Ao meu filho pelo sua compreensão, ânimo, energia, e positivismo para a realização desta dissertação.

À minha namorada agradeço o grande incentivo e apoio moral que em momentos mais difíceis, deu-me alento para seguir em frente.

E por último agradeço a todos os meus colegas de mestrado que pelo seu auxílio e companheirismo possibilitaram a concretização desta etapa.



*“O processo de descoberta científica é, na verdade, um voo contínuo a partir da incógnita”*

**Albert Einstein (1879-1955)**





## Resumo

A actual tendência de consumo exponencial de combustíveis fósseis, para a satisfação das necessidades energéticas mundiais, terá como consequência uma diminuição das reservas existentes e um aumento das emissões de gases de efeito de estufa, tais como CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O.

Perante este cenário, torna-se imperativo reduzir a dependência de combustíveis fósseis, através da implementação de fontes de energia renovável, de modo a garantir a sustentabilidade energética a nível mundial. A produção de H<sub>2</sub> por via biológica (bioH<sub>2</sub>) surge como uma fonte de energia renovável e complementar, com elevado potencial.

O objectivo principal deste trabalho foi estudar e comparar a utilização de diferentes fontes de carbono, contidas em resíduos ou subprodutos industriais, como substrato num processo fermentativo anaeróbio de produção de bioH<sub>2</sub>. Nomeadamente, subprodutos da produção de biodiesel (glicerol em bruto), hidrolisados de pasta de papel (resíduos lenhocelolósicos) e de biomassa microalgal (*Scenedesmus obliquus*).

Numa primeira fase, com vista a estabelecer e otimizar condições físico-químicas e operacionais, estudou-se o efeito de parâmetros influentes no desenvolvimento do processo, como a metodologia de inoculação e a concentração do inóculo e a metodologia de recolha da fase gasosa produzida em reactores encapsulados.

Definidos os procedimentos e as condições óptimas, passou-se à segunda fase do trabalho, em que se avaliaram parâmetros de resposta importantes do processo, como o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio e a velocidade de produção de H<sub>2</sub>, para cada um dos substratos em estudo. Em todos os ensaios procedeu-se à análise qualitativa e quantitativa da fase gasosa produzida e da fase líquida resultante da fermentação, por cromatografia gasosa e HPLC, respectivamente, para uma melhor interpretação do desempenho *Enterobacter aerogenes* na presença de cada tipo de substrato.

Os resultados obtidos mostraram que a bactéria foi eficiente na conversão dos três substratos utilizados, em bioH<sub>2</sub>, embora com valores de taxa de produção de H<sub>2</sub> e de rendimento global do processo claramente distintos. De facto, os valores mais elevados atingidos para a velocidade e rendimento de produção de H<sub>2</sub> foram,

respectivamente, de 12,5 mL/h e 0,38 L/g<sub>Substrato consumido</sub>, quando se utilizou o glicerol em bruto como fonte de carbono. Para os hidrolisados da pasta de papel e biomassa microalgal, registaram-se rendimentos de produção de H<sub>2</sub> na ordem dos 0,13 e 0,02 L/g<sub>Substrato consumido</sub>, respectivamente.

Numa tentativa de incremento dos baixos valores registados para as microalgas, como substrato, estudou-se ainda o efeito da variação de alguns parâmetros operacionais e ambientais, sobre o desempenho do processo, como o tempo de autoclavagem do meio de crescimento e de fermentação, presença de microalgas no pré-inóculo e moagem das microalgas, antes da sua utilização. As alterações aplicadas não conduziram, em geral, a resultados promissores, verificando-se até uma diminuição do rendimento do processo em cerca de 20%, quando se aumentou o tempo de autoclavagem do meio de fermentação de 15 para 30 minutos, o que sugere a libertação de compostos tóxicos, dificultando o processo de conversão biológica. A presença de microalgas no pré-inóculo e a moagem das microalgas, antes da sua utilização, mostraram-se igualmente pouco eficazes na obtenção de valores mais elevados de velocidade de produção de H<sub>2</sub> e de rendimento global do processo.

Palavras-chave: Biohidrogénio, *Enterobacter aerogenes*, fermentação anaeróbia, glicerol em bruto, microalgas, resíduos lenhocelolósicos

## Abstract

The current trend of exponential consumption of fossil fuels, to meet the world's energy needs, will result in a reduction of existing reserves and increase on greenhouse gases emissions, such as CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O.

Under this scenario it becomes imperative to reduce dependence on fossil fuels through the implementation of renewable energy sources, to ensure the sustainability of global energy. The H<sub>2</sub> production by biological means (bioH<sub>2</sub>) emerges as a renewable energy source and supplement with high potential.

The main objective of this study was to compare the use of different carbon sources, as substrate, in a dark-fermentation process to produce bioH<sub>2</sub>. Namely, byproducts of biodiesel production (crude glycerol), hydrolyzed paper pulp (lignocellulosic residues) and microalgal biomass (*Scenedesmus obliquus*).

Initially, in order to establish and optimize operating and physical-chemical process conditions, the effect of influent ambient and operational conditions on the process yield, such as, inoculum concentration and inoculation and collecting of gas phase, methodologies, was evaluated.

In the best conditions, the definition of important parameters, like the time required for the system to reach the equilibrium and the production rate of H<sub>2</sub>, for each substrate, was studied. In all experiments, samples were taken for qualitative and quantitative analysis of the produced biogas (H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>), by GC and resulting liquid phase of the process, by HPLC, for a better assessment of the *Enterobacter aerogenes* performance in the presence of each substrate.

The results obtained showed that the strain of the bacteria, used in this work, was efficient in conversion of the three complex substrates, particularly with regard to crude glycerol, as carbon source, for the which it was reported the highest values of H<sub>2</sub> production rate and process yield 12,5 mL/h and 0,38 L/g<sub>Substrate consumed</sub>, respectively. When paper sludge hydrolysates and microalgal biomass were used as carbon source, the values of H<sub>2</sub> production yields were of 0,13 and 0,02 L/g<sub>Substrate consumed</sub>, respectively.

In an attempt to increase the low values recorded for the microalgae, as substrate, the effect of changing some operating and environmental parameters on the process performance, such as, time of sterilization of growth and fermentation media,

presence of microalgae in the pre-inoculum and milling of microalgae, before its use, were estimated. In general, the results were not promising. Actually, a decrease of about 20%, in the process yield was recorded with the increased of the sterilization time of fermentation medium, from 15 to 30 minutes, suggesting the release of toxic compounds and subsequent inhibition of biological conversion. The presence of microalgae in the pre-inoculum and the grinding of microalgae, before its use, also were not very efficient as regards the best results of bioH<sub>2</sub> production.

Keywords: biohydrogen, *Enterobacter aerogenes*, anaerobic fermentation, crude glycerol, microalgae, lignocellulosic residues

# Índice

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>XVII</b>
<b>CAPÍTULO 1: ENQUADRAMENTO TEÓRICO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 RECURSOS ENERGÉTICOS FÓSSEIS</b>	<b>3</b>
• PETRÓLEO	3
• GÁS NATURAL	3
• CARVÃO	4
<b>1.2 ENERGIAS RENOVÁVEIS</b>	<b>5</b>
• ENERGIA EÓLICA	5
• HIDROELÉCTRICA	6
• ENERGIA SOLAR	6
• BIOCOMBUSTÍVEIS	6
• HIDROGÉNIO	8
<b>1.3 BIOHIDROGÉNIO</b>	<b>9</b>
1.3.1 BIO-FOTÓLISE	10
1.3.2 FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA NO ESCURO ( <i>DARK FERMENTATION</i> )	11
1.3.3 TIPO DE SUBSTRATOS	12
✓ GLUCOSE	12
✓ GLICEROL	13
✓ CELULOSE	14
1.3.3.1 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS	14
1.3.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE HIDROGÉNIO	15
1.3.5 EFEITO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS E FÍSICO-QUÍMICAS	17
1.3.5.1 TEMPERATURA	18
1.3.5.2 PH	18
1.3.5.3 EFEITO DA PRESENÇA DE AZOTO E DE IÕES FOSFATO E METÁLICOS	18
1.3.5.4 TIPO DE REACTORES	19
<b>CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>2.1 MATERIAIS</b>	<b>23</b>
2.1.1 MICRORGANISMO	23
2.1.2 MEIO DE CRESCIMENTO	23
2.1.3 MEIO DE FERMENTAÇÃO	24
2.1.4 SUBSTRATOS	25
2.1.5 EQUIPAMENTO	25
2.1.6 MONTAGEM EXPERIMENTAL	26

<b>2.2 MÉTODOS</b>	<b>27</b>
2.2.1 CRESCIMENTO DA ESTIRPE DA BACTÉRIA <i>Enterobacter aerogenes</i>	27
2.2.2 METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO E DE RECOLHA DA FASE GASOSA PRODUZIDA, NOS REACTORES ENCAPSULADOS, PARA ANÁLISE	29
2.2.3 PRODUÇÃO DE HIDROGÉNIO POR VIA BIOLÓGICA (BIOH <sub>2</sub> )	30
<b>2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	<b>31</b>
2.3.1 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DA BIOMASSA	31
2.3.2 DETERMINAÇÃO DOS TEORES EM H <sub>2</sub> E CO <sub>2</sub> NA FASE GASOSA	32
2.3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO EM ÁCIDOS GORDOS VOLÁTEIS (AGV's), ETANOL E AÇÚCARES NA FASE LÍQUIDA	33
<b>CAPÍTULO 3: DISCUSSÃO DE RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1 PRODUÇÃO DAS CÉLULAS DE <i>Enterobacter aerogenes</i></b>	<b>37</b>
3.1.1 CRESCIMENTO DA BIOMASSA	37
3.1.2 DETERMINAÇÃO DA RECTA DE CALIBRAÇÃO DENSIDADE ÓPTICA (D.O.) VS PESO SECO (P.S.)	38
<b>3.2 PRODUÇÃO DE BIOH<sub>2</sub> A PARTIR DE SUBSTRATOS COMPLEXOS</b>	<b>40</b>
3.2.1 OPTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS	40
3.2.1.1 INOCULAÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO	40
3.2.1.2 RECOLHA DA FASE GASOSA DOS REACTORES ENCAPSULADOS	42
<b>3.3 EFEITO DO TIPO DE SUBSTRATO</b>	<b>43</b>
3.3.1 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO DO PROCESSO	44
3.3.1.1 SUBPRODUTOS DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL (GLICEROL EM BRUTO)	44
3.3.1.2 HIDROLISADO DE PASTA DE PAPEL	46
3.3.1.3 HIDROLISADO TÉRMICO DA MICROALGA <i>S. obliquus</i>	48
3.3.2 DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOH <sub>2</sub>	51
3.3.2.1 SUBPRODUTOS DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL (GLICEROL EM BRUTO)	51
3.3.2.2 HIDROLISADO DA PASTA DE PAPEL	54
3.3.2.3 HIDROLISADO TÉRMICO DA MICROALGA <i>S. obliquus</i>	57
<b>3.4 ALTERAÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS PARA OPTIMIZAÇÃO DO PROCESSO</b>	<b>61</b>
3.4.1 EFEITO DO TEMPO DE AUTOCLAVAGEM DO MEIO CONTENDO BIOMASSA MICROALGAL	62
3.4.2 EFEITO DA PRESENÇA DE MICROALGAS NO PRÉ-INOCULO	63
3.4.3 ESTUDO DO EFEITO DA MOAGEM DAS MICROALGAS	65
<b>CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFIA</b>	<b>75</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> - Esquema representativo do fluxo de fótons e electrões. _____	11
<b>Figura 1.2</b> - Via metabólica de fermentação anaeróbia da glucose pela bactéria <i>E. aerogenes</i> . _____	17
<b>Figura 1.3</b> - Diagrama esquemático do reactor CSTR. _____	20
<b>Figura 2.1</b> - Montagem experimental utilizada para a produção de H <sub>2</sub> , por via biológica, em reactores <i>Mariotte</i> com agitação magnética, na câmara de aquecimento com temperatura regulada a 30°C – Determinação do tempo de equilíbrio do processo e avaliação da metodologia de inoculação _____	26
<b>Figura 2.2</b> - Reactor encapsulado – determinação dos perfis de produção de H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , ácidos e etanol e de consumo de substrato, ao longo do tempo. _____	27
<b>Figura 3.1</b> - Curva de crescimento da estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATCC 13048 <i>Sputum</i> ), em meio líquido (peptona, 20 g/L e NaCl, 5 g/L), numa incubadora com agitação orbital de 150 rpm, a 30°C. _____	37
<b>Figura 3.2</b> - Recta de calibração D.O. vs p.s. obtida para o crescimento de células de <i>E. aerogenes</i> em água de peptona, em condições de T=30°C e 150 rpm. _____	39
<b>Figura 3.3</b> - Comparação do volume de H <sub>2</sub> produzido pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATCC 13048 <i>Sputum</i> ), a partir de subprodutos da produção de biodiesel (10 g/L), hidrolisado de pasta de papel (10 g/L) e biomassa microalgal (10 g/L). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=1/6$ [Biomassa] <sub>i</sub> =0,1 gBiom. seca/LMeio de ferment. _____	50
<b>Figura 3.4</b> - Perfil de produção de H <sub>2</sub> (▲) e da razão volumétrica H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (■), ao longo do processo usando, como substrato, subprodutos da produção de biodiesel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ , [Biomassa] <sub>i</sub> =0,1 gBiom. seca/LMeio de ferment., [Glicerol] <sub>i</sub> =10g/L. _____	52
<b>Figura 3.5</b> - Perfis de produção de ácido láctico (◇), ácido acético (△), ácido propiónico (■), etanol (○), H <sub>2</sub> (▲) e consumo de glicerol (◇), ao longo do processo usando, como substrato, subprodutos da produção de biodiesel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ , [Biomassa] <sub>i</sub> =0,1 gBiom. seca/LMeio de ferment., [Glicerol] <sub>i</sub> =10g/L. _____	54
<b>Figura 3.6</b> - Perfil de produção de H <sub>2</sub> (▲) e da razão volumétrica H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (■) ao longo do processo usando, como substrato hidrolisado de pasta de papel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ , [Biomassa] <sub>i</sub> =0,1 gBiom. seca/LMeio de ferment., [glucose + xilose + celobiose] <sub>i</sub> =10g/L. _____	55
<b>Figura 3.7</b> - Perfis de produção de ácido láctico (◇), ácido acético (△), etanol (○), H <sub>2</sub> (▲) e consumo de glucose (×), xilose (●), e celobiose (■), ao longo do processo usando, como substrato, Hidrolisado de pasta de papel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ , [Biomassa] <sub>i</sub> =0,1 gBiom. seca/LMeio de ferment., [glucose + xilose + celobiose] <sub>i</sub> =10 g/L. _____	57

**Figura 3.8** - Perfis de produção de  $H_2$  (▲) e razão volumétrica  $H_2/CO_2$  (■) ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgal. Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Biomassa\ microalgal]_i=10g/L$ . \_\_\_\_\_ 58

**Figura 3.9** - Perfis de produção de ácido láctico (◇), ácido fórmico (+), ácido acético (△), ácido propiónico (■), etanol (○) e  $H_2$  (▲), ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgal. Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Biomassa\ microalgal]_i=10g/L$ . \_\_\_\_\_ 60

**Figura 3.10** - Comparação da velocidade de produção de  $bioH_2$  em função dos diferentes tipos de substratos usados ao longo do processo, como os subprodutos de produção de biodiesel (◇), o hidrolisado de pasta de papel (□) e a biomassa microalgal (△). Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação orbital=200 rpm,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ . \_\_\_\_\_ 61

**Figura 3.11** - Rendimentos de produção de  $H_2$  na presença (■) e na ausência (□) de microalgas no pré-inoculo, e razões  $H_2/CO_2$  (□) para diferentes tempos de autoclavagem. Condições experimentais: Tempo de autoclavagem do meio de crescimento contendo 1 g/L de microalgas=15 e 30min; Tempo de autoclavagem do meio de fermentação contendo 10 g/L de microalgas=15 e 30min;  $T=30^\circ C$ , agitação magnética,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Bactérias]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Biomassa\ microalgal]_i=10\ g/L$ . \_\_\_\_\_ 64

**Figura 3.12** - Perfis de produção de  $H_2$  (▲) e razão volumétrica  $H_2/CO_2$  (■) ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgal com moagem (a) e sem moagem (b). Determinação da velocidade de produção de  $H_2$ . Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Biomassa\ microalgal]_i=10g/L$ . \_\_\_\_\_ 66

**Figura 3.13** - Perfis de produção de ácido láctico (◇), ácido fórmico (+), ácido acético (△), ácido propiónico (■), etanol (○) e  $H_2$  (▲), ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgas com moagem (a) e sem moagem (b). Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Biomassa\ microalgal]_i=10g/L$ . \_\_\_\_\_ 67



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Densidade energética de diferentes combustíveis.	8
<b>Tabela 2.1</b> - Composição do meio de crescimento para a bactéria <i>E. aerogenes</i> .	23
<b>Tabela 2.2</b> - Composição do meio de fermentação.	24
<b>Tabela 3.1</b> - Valores de D.O. e p.s. correspondentes para diferentes suspensões celulares da bactéria <i>Enterobacter aerogenes</i> , preparadas a partir de uma solução <i>stock</i> .	39
<b>Tabela 3.2</b> - Rendimentos de produção de H <sub>2</sub> ( $\eta$ ) obtidos para diferentes concentrações de bactérias inoculadas, segundo diferentes metodologias. Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ , $[\text{Glicerol}]_i=10$ g/L.	41
<b>Tabela 3.3</b> - Volumes de H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> , obtidos pela recolha de fase gasosa no topo e no meio da <i>headspace</i> em reactores encapsulados sob pressão e após despressurização. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ , $[\text{Biomassa}]_i=0,1$ g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , $[\text{Glicerol}]_i=10$ g/L.	42
<b>Tabela 3.4</b> - Volumes de H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> , produzidos a partir da conversão biológica de subprodutos da produção de biodiesel pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATTCC 13048 <i>Sputum</i> ). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ , $[\text{Biomassa}]_i=0,1$ g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , $[\text{Glicerol}]_i=10$ g/L.	45
<b>Tabela 3.5</b> - Teores de AGV's, etanol e pH da fase líquida a partir da conversão biológica de subprodutos da produção de biodiesel pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATTCC 13048 <i>Sputum</i> ). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ , $[\text{Biomassa}]_i=0,1$ g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , $[\text{Glicerol}]_i=10$ g/L.	45
<b>Tabela 3.6</b> - Rendimentos de produção de H <sub>2</sub> ( $\eta$ ) a partir da conversão biológica de subprodutos da produção de biodiesel pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATTCC 13048 <i>Sputum</i> ). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ , $[\text{Biomassa}]_i=0,1$ g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , $[\text{Glicerol}]_i=10$ g/L.	46
<b>Tabela 3.7</b> - Volumes de H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> , produzidos a partir da conversão biológica de hidrolisado de pasta de papel pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATTCC 13048 <i>Sputum</i> ). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ , $[\text{Biomassa}]_i=0,1$ g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , $[\text{glucose} + \text{xilose} + \text{celobiose}]_i=10$ g/L.	47
<b>Tabela 3.8</b> - Teores de AGV's, etanol e pH da fase líquida a partir da conversão biológica de hidrolisado de pasta de papel pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATTCC 13048 <i>Sputum</i> ). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ , $[\text{Biomassa}]_i=0,1$ g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , $[\text{glucose} + \text{xilose} + \text{celobiose}]_i=10$ g/L.	47

<b>Tabela 3.9</b> - Rendimentos de produção de H <sub>2</sub> (η) a partir da conversão biológica de hidrolisado de pasta de papel pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATTCC 13048 <i>Sputum</i> ). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, V <sub>Reactor</sub> /V <sub>Fase líquida</sub> =6, [Biomassa] <sub>i</sub> =0,1 g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , [glucose + xilose + celobiose] <sub>i</sub> =10 g/L.	48
<b>Tabela 3.10</b> - Volumes de H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> , produzidos a partir da conversão biológica de biomassa microalgal pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATTCC 13048 <i>Sputum</i> ). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, V <sub>Reactor</sub> /V <sub>Fase líquida</sub> =6, [Bactérias] <sub>i</sub> =0,1 g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , [Biomassa microalgal] <sub>i</sub> =10 g/L.	49
<b>Tabela 3.11</b> - Teores em AGV's e etanol e pH da fase líquida, a partir da conversão biológica de biomassa microalgal pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATTCC 13048 <i>Sputum</i> ). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, V <sub>Reactor</sub> /V <sub>Fase líquida</sub> =6, [Bactérias] <sub>i</sub> =0,1 g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , [Biomassa microalgal] <sub>i</sub> =10 g/L.	49
<b>Tabela 3.12</b> - Rendimentos de produção de H <sub>2</sub> (η) a partir da conversão biológica de biomassa microalgal pela estirpe da bactéria <i>E. aerogenes</i> (ATTCC 13048 <i>Sputum</i> ). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, V <sub>Reactor</sub> /V <sub>Fase líquida</sub> =6, [Bactérias] <sub>i</sub> =0,1 g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , [Biomassa microalgal] <sub>i</sub> =10 g/L.	50
<b>Tabela 3.13</b> - Rendimentos de produção de H <sub>2</sub> ao longo do processo usando, como substrato, subprodutos da produção de biodiesel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, V <sub>Reactor</sub> /V <sub>Fase líquida</sub> =6, [Biomassa] <sub>i</sub> =0,1 g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , [Glicerol] <sub>i</sub> =10 g/L.	53
<b>Tabela 3.14</b> - Rendimentos de produção de H <sub>2</sub> ao longo do processo usando, como substrato, hidrolisado de pasta de papel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, V <sub>Reactor</sub> /V <sub>Fase líquida</sub> =6, [Biomassa] <sub>i</sub> =0,1 g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , [glucose + xilose + celobiose] <sub>i</sub> =10 g/L.	56
<b>Tabela 3.15</b> - Rendimentos de produção de H <sub>2</sub> ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgal. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, V <sub>Reactor</sub> /V <sub>Fase líquida</sub> =6, [Biomassa] <sub>i</sub> =0,1 g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , [Biomassa microalgal] <sub>i</sub> =10 g/L.	59
<b>Tabela 3.16</b> - Efeito do tempo de autoclavagem do meio contendo 10g/L de microalgas sobre os rendimentos de produção de H <sub>2</sub> e razões H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> . Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, V <sub>Reactor</sub> /V <sub>Fase líquida</sub> =6, [Bactérias] <sub>i</sub> =0,1 g <sub>Biom. seca</sub> /L <sub>Meio de ferment</sub> , [Biomassa microalgal] <sub>i</sub> =10 g/L.	62

# **Capítulo 1: Enquadramento Teórico**



## 1.1 Recursos energéticos fósseis

Desde os primórdios da revolução industrial que a Humanidade baseia o seu desenvolvimento tecnológico e necessidades energéticas em combustíveis de origem fóssil não renovável. De facto, a sua utilização permitiu atingir patamares de desenvolvimento sem precedentes na história da Humanidade.

De seguida, apresentam-se algumas características e observações sobre três dos mais conhecidos combustíveis fósseis: o petróleo, o gás natural e o carvão.

- **Petróleo**

O petróleo é um combustível fóssil de origem orgânica rico em carbono e hidrogénio, tendo como principal finalidade o fornecimento de energia para o sector dos transportes. O consumo mundial de petróleo está estimado em  $87,4 \times 10^6$  de barris por dia, para uma reserva mundial, que está calculada em  $1526,3 \times 10^8$  de barris (BP *Statistical Review*, 2011).

Tendo em conta a reserva mundial de petróleo e a actual taxa de consumo é possível prever que as reservas existentes poderão atingir o seu limite em menos de 50 anos.

- **Gás Natural**

O gás natural é uma mistura de hidrocarbonetos gasosos, em que 70 a 90% correspondem à fracção do metano, enquanto os restantes 0 a 20% correspondem à fracção de etano, propano e butano. Este tipo de combustível fóssil é utilizado para produção de energia eléctrica e também de energia térmica nos sectores residencial, comercial e industrial.

As reservas mundiais de gás natural estão calculadas em  $187000 \times 10^9$  de metros cúbicos, com um consumo anual de  $3169 \times 10^9$  de metros cúbicos. À taxa actual de

consumo prevê-se que o gás natural atinja o limite das reservas em cerca de 60 anos (BP *Statistical Review*, 2011).

- **Carvão**

O carvão é um combustível sólido de origem fóssil, composto principalmente por carbono e por pequenas fracções de outros elementos como hidrogénio, enxofre, azoto e oxigénio. O carvão é utilizado principalmente como combustível para a produção de electricidade e calor, por um processo de combustão.

As reservas de carvão estão calculadas em  $860938 \times 10^6$  de toneladas equivalentes de petróleo tendo sido registado, em 2010, um consumo mundial de  $3555 \times 10^6$  de toneladas equivalentes de petróleo (BP *Statistical Review*, 2011). O carvão detém uma das maiores reservas mundiais, pelo que à taxa de consumo actual, é esperado que as suas reservas se esgotem em 250 anos.

Apesar da forte contribuição dos combustíveis de origem fóssil para o desenvolvimento da Humanidade, o seu consumo indiscriminado atingiu tal dimensão que, além de conduzir a uma forte diminuição de reservas, contribui igualmente para um aumento significativo da poluição ambiental em termos de emissões gasosas (Das e Veziroglu, 2008). De facto, estudos realizados demonstraram um aumento significativo das concentrações de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O na atmosfera, como resultado das actividades humanas desde o início da revolução industrial. Além disso, tem-se verificado que a maior parte das emissões de gases com efeito de estufa são geradas pelos sectores da produção de energia eléctrica, transportes e indústria, especialmente no período compreendido entre 1970 e 2004, quando comparado com outros sectores como os do comércio, florestas, residencial e agricultura (IPCC *Fourth Assessment*, 2007).

Todos estes factores apontados, no que respeita à utilização de combustíveis fósseis e suas desvantagens do ponto de vista ambiental, conduziram a uma procura de fontes alternativas e renováveis no sentido da independência, pelo

menos parcial, da sua utilização, num conceito de produção de energia limpa e vectores energéticos sustentáveis.

## 1.2 Energias Renováveis

Entende-se por energia renovável, qualquer recurso energético que é regenerado naturalmente num curto espaço de tempo e que deriva directa e indirectamente de fontes energéticas como o Sol, vento, ondas e biomassa.

Na última década, as energias renováveis tornaram-se uma importante componente no fornecimento de energia eléctrica a nível mundial. Na realidade, com os incentivos governamentais e os preços de combustíveis fósseis a aumentar, as energias renováveis aumentaram a sua atractividade para muitos países investidores (*International Energy Agency*, 2010).

Para converter os recursos energéticos renováveis em energia útil é necessário recorrer-se a tecnologias tais como aerogeradores, hidroeléctricas, painéis solares e biorefinarias.

- **Energia Eólica**

A exploração da energia eólica é provida por aerogeradores que captam a energia cinética do vento, e transformam em energia eléctrica. Este tipo de tecnologia é bastante popular pelo facto de ter elevadas produções de energia eléctrica em relação às outras tecnologias existentes. A intermitência da velocidade do vento é um dos factores negativos, que tem como grande resultado flutuações de energia eléctrica na rede (*International Energy Agency*, 2010).

- **Hidroeléctrica**

A Hidroeléctrica explora a energia potencial da água, convertendo em energia eléctrica. É uma das energias renováveis mais madura, e mais utilizadas no mundo. A flexibilidade de utilização mostra-se como o seu ponto mais forte, facilitando assim a gestão da produção de energia para a rede.

Contudo, o desenvolvimento de hidroeléctricas, é ambiental e socialmente controversa, tendo em conta a análise custo/benefício da sua construção e utilização (*International Energy Agency*, 2010).

- **Energia Solar**

A energia solar é um dos maiores recursos energéticos do planeta. Para captura de energia solar existem três tipos de tecnologias de captação em colectores solares e conversão. Nomeadamente os colectores solares fotovoltaicos, colectores solares concentradores e colectores solares térmicos.

A tecnologia solar fotovoltaica permite converter a radiação solar em electricidade, utilizando semicondutores (células fotovoltaicas).

Os colectores solares concentradores são construídos tendo em conta um *design* que permite atingir elevadas temperaturas com geração de calor e energia eléctrica.

Por último, os colectores solares térmicos utilizam a energia solar para produzir calor através do aquecimento de fluidos com circulação forçada, tendo como aplicação prática mais conhecida as águas sanitárias (*International Energy Agency*, 2010).

- **Biocombustíveis**

Os biocombustíveis são todos os combustíveis sólidos, líquidos ou gasosos, produzidos a partir de fontes biológicas e renováveis.

A produção de biocombustíveis líquidos pode ser dividida em quatro tecnologias de conversão diferentes: biocombustíveis de primeira geração (BPG); biocombustíveis



de segunda geração (BSG); biocombustíveis de terceira geração (BTG); biocombustíveis de quarta geração (BQG) (Demirbas, 2009).

Os biocombustíveis de primeira geração (ex. etanol e biodiesel) são produzidos a partir de tecnologias bem conhecidas e envolvem o processamento de culturas energéticas como cereais, milho, girassol e beterraba. Contudo, este tipo de culturas é normalmente utilizada para alimentação humana e animal, podendo isso colocar em causa o seu recurso para a produção de biocombustíveis, no sentido de não dar origem a graves desequilíbrios no fornecimento regular de alimentos para as populações (Demirbas, 2009). Este facto conduziu ao estudo de fontes oleaginosas alternativas e a novas tecnologias mais avançadas de produção de biocombustíveis de segunda, terceira e quarta geração.

A tecnologia de produção de biocombustíveis de segunda geração foi desenvolvida com utilização, por via biológica ou termoquímica, de resíduos lenhocelulósicos provenientes da actividade agrícola e florestal, para a produção de biocombustíveis tais como o bioetanol e bio-óleo.

Os biocombustíveis de terceira geração são produzidos a partir de óleos extraídos de espécies específicas de algas (Brennan e Owende, 2010), por processos químicos e mecânicos, para a produção de biodiesel (Demirbas, 2009).

Os biocombustíveis de quarta geração são obtidos através da conversão directa de óleos e gorduras usados, em hidrocarbonetos, através de processos termoquímicos de hidrogenação. A hidrogenação de óleos e gorduras resulta na produção de hidrocarbonetos como produto principal, propano, água, CO e CO<sub>2</sub>, como subprodutos (Quido *et al.*, 2009).

No que respeita à produção de biocombustíveis gasosos, o H<sub>2</sub> é bastante promissor e apresenta vários benefícios técnicos, socioeconómicos e ambientais (Das, 2009).

A Directiva Europeia 2009/28/CE, transposta para a legislação nacional pelo DL 117/2010, estabelece como meta obrigatória a incorporação de 10% de biocombustíveis, ou outros combustíveis renováveis, no sector dos transportes, até 2020. Assim, fica definida a cota de energia final que deverá ser consumida pelo sector dos transportes a partir do conjunto das fontes renováveis e não apenas a partir de biocombustíveis (Directiva Europeia 2009/28/CE, DL 117/2010).

## • Hidrogénio

O hidrogénio é o elemento químico mais leve da tabela periódica, com apenas 1,0079 g/mol e uma densidade de 0,09 g/cm<sup>3</sup>. Em condições de pressão e temperatura normal (T=0°C; P=1atm), o hidrogénio molecular apresenta-se no estado gasoso.

Em comparação com os hidrocarbonetos, a combustão do H<sub>2</sub> tem apenas como resultado a formação de água e a libertação de grandes quantidades de energia, enquanto a combustão de hidrocarbonetos resulta na emissão de gases de efeito de estufa. Além das emissões nefastas originadas pela combustão de hidrocarbonetos, estes apresentam uma densidade energética entre 20 - 50 MJ/kg, enquanto o H<sub>2</sub> apresenta uma densidade energética de 120 MJ/kg, isto é, cerca de 2,4 vezes superior (Tabela 1.1). No entanto, em condições PTN, a densidade energética de 1 litro de H<sub>2</sub> é de apenas 0,010 MJ, o que corresponde a um valor três ordens de grandeza inferior aos restantes hidrocarbonetos, que apresentam valores entre 15,9 MJ/L, para o metanol, e de 31,1 MJ/L, para a gasolina (Thomas, 2000).

Tabela 1.1 - Densidade energética de diferentes combustíveis (Adaptado de Thomas, 2000).

Combustível	Fracção do peso de hidrogénio	Estado físico em condições PTN	Densidade energética (MJ/kg)
Hidrogénio	1,00	Gasoso	120,00
Metano	0,25	Gasoso	50,00
Etano	0,20	Gasoso	47,50
Propano	0,18	Gasoso	46,40
Gasolina	0,16	Líquido	44,40
Etanol	0,13	Líquido	26,80
Metanol	0,12	Líquido	19,90

O H<sub>2</sub> pode ser utilizado como combustível em motores de combustão interna para a propulsão de veículos de transporte, ou em células de combustível para a produção de energia eléctrica. Contudo, grande parte do H<sub>2</sub> produzido mundialmente é

consumido pelas indústrias de fertilizantes (50%) e de petróleo (37%) (Das e Veziroglu, 2008).

Actualmente, a maior percentagem de produção de  $H_2$  ocorre por refinação de hidrocarbonetos. Cerca de 40% tem origem no gás natural, 30 % nos óleos pesados ou nafta e 18% no carvão. Apenas 5% tem origem na electrólise da água (Das e Veziroglu, 2008; Sinha e Pandley, 2011). Porém, a produção de  $H_2$  por processos químicos e electroquímicos revela-se pouco sustentável do ponto de vista do balanço energético, dada a quantidade de energia gasta para o produzir e armazenar. Assim, as tecnologias de produção de  $H_2$  por via biológica ( $bioH_2$ ) têm sido estudadas como uma alternativa sustentável aos processos convencionais, principalmente porque permitem a utilização de fontes renováveis e ocorrem em condições de temperatura ambiente e à pressão atmosférica (Das e Veziroglu, 2008).

### 1.3 Biohidrogénio

A produção de  $bioH_2$  por via biológica resulta da actividade de microrganismos como bactérias, por degradação de carboidratos como substrato (resíduos agro-industriais ou outros subprodutos orgânicos de processos industriais), ou microalgas por bio-fotólise da água.

Uma das vantagens da produção de  $H_2$  por via biológica, sobre os processos químicos convencionais, reside no facto dos microrganismos serem selectivos para o substrato, mesmo quando este se encontra em mistura com outros compostos. Isto consiste numa vantagem, pois permite não só minimizar ou mesmo suprimir a necessidade de aplicação de passos intermédios de purificação, como utilizar um maior espectro de resíduos industriais, como substratos no processo fermentativo. Assim, minimiza-se a necessidade de isolar e purificar o substrato fundamental ao processo, o que se traduz num maior espectro de compostos a utilizar, havendo menor necessidade de tratamentos químicos (Drapcho *et al.*, 2008).

A produção biológica do  $H_2$  apenas contribui com uma pequena porção, cerca de 1%, para o total produzido, sendo que se espera que esta cresça,

exponencialmente, com o acompanhar da inovação e desenvolvimento de novas técnicas e processos (Drapcho *et al.*, 2008).

A produção de  $H_2$  por via biológica pode ocorrer por três tipos de processos, nomeadamente:

- Bio-fotólise da água (algas ou cianobactérias);
- Fermentação anaeróbia no escuro/*dark-fermentation* (bactérias anaeróbias estritas ou facultativas);
- Sistema híbrido (bactérias fotossintéticas e fermentativas).

### 1.3.1 Bio-fotólise

A produção de  $H_2$  a partir da bio-fotólise da molécula de água, por algas e cianobactérias, consiste na conversão desta molécula em iões hidrogénio e moléculas de oxigénio, através da fotossíntese. Os iões hidrogénio são depois convertidos a hidrogénio molecular pela enzima hidrogenase. Assim, os microrganismos fotoautotróficos possuem mecanismo de captura de energia solar para a produção de oxigénio e hidrogénio. Ao absorver fotões com um comprimento de onda inferior a 680 nm, o fotossistema II gera um forte poder oxidante capaz de fragmentar a molécula de água em protões ( $H^+$ ), electrões e oxigénio molecular (Yu e Takahashi, 2007). Por sua vez, os electrões gerados no fotossistema II são transportados através da membrana celular pelo citocromo até ao fotossistema I. No fotossistema I ocorre absorção de fotões com um comprimento de onda inferior a 700 nm, permitindo assim a redução da ferredoxina. Posteriormente, a ferredoxina reduzida é utilizada pela enzima hidrogenase para a redução dos protões de ( $H^+$ ) em hidrogénio molecular ( $H_2$ ).

Este processo exhibe como grande vantagem a capacidade de produzir  $H_2$  a partir de água e de radiação solar. No entanto, para que a produção de  $H_2$  atinja o seu potencial máximo, é necessário uma elevada quantidade de radiação solar.

A conversão da molécula de água em  $O_2$  e  $H_2$  é representada pela Figura 1.1.

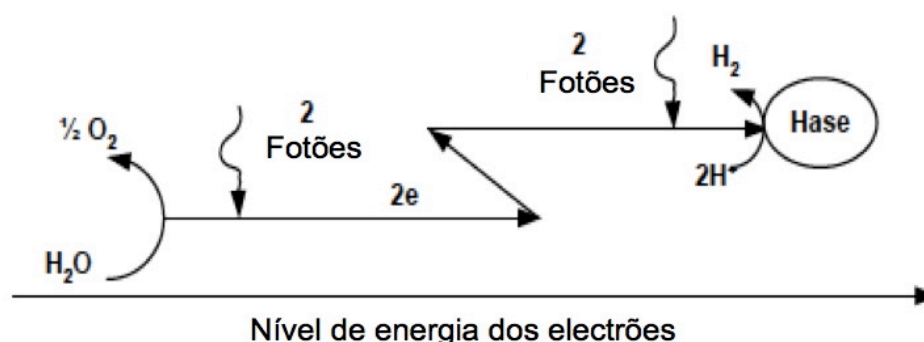


Figura 1.1 - Esquema representativo do fluxo de fotões e electrões (Adaptado de Yu e Takahashi, 2007).

Uma espécie de alga produtora de  $H_2$ , bem conhecida, é a *Chlamydomonas reinhardtii*, tendo sido também detectada actividade da enzima hidrogenase em algas verdes (*Scenedesmus obliquus*) e em algas verdes marinhas (*Chlorococum littorale* e *Playtmonas subcordiformis*) (Kapdan *et al.*, 2006). Uma estirpe da cianobactéria *Anabaena* sp. demonstrou igualmente produzir  $H_2$  com um rendimento de 0,128 kg  $H_2$ /kg biomassa, em condições de elevada intensidade de luz e em atmosfera gasosa contendo  $Ar + CO_2$  e  $N_2$  (Marques *et al.*, 2011).

A produção de  $H_2$  por algas pode ser considerada economicamente viável e sustentável em termos da utilização de água como fonte renovável e consumo de  $CO_2$ . Contudo, este processo apresenta algumas limitações, como a inibição da enzima hidrogenase em presença do  $O_2$  e o facto de não ser possível metabolizar resíduos industriais, não contribuindo assim para a diminuição da sua carga orgânica (Kapdan *et al.*, 2006). Nesse aspecto, a fermentação no escuro e a foto-fermentação são consideradas como vantajosas, pois a produção de  $H_2$  poder ser realizada a partir de resíduos, associando dois factores, o tratamento de um efluente e a produção de “energia limpa” (Kapdan *et al.*, 2006).

### 1.3.2 Fermentação anaeróbia no escuro (*dark fermentation*)

A produção de  $H_2$  por bactérias anaeróbias, no escuro (*dark fermentation*), ocorre com oxidação de diferentes substratos orgânicos (carboidratos) em condições anóxicas, isto é, na ausência de  $O_2$  como aceitador de electrões. Ou seja, enquanto

que em condições de aerobiose, o  $O_2$  é reduzido à molécula de água, em condições anaeróbias são os iões  $H^+$  que são reduzidos a hidrogénio molecular ( $H_2$ ), actuando como aceitadores de electrões. A oxidação dos substratos orgânicos fornece a energia necessária para o crescimento metabólico das bactérias (crescimento heterotrófico). Esta oxidação gera electrões, os quais se distribuem de modo a manter a neutralidade electrónica (Das e Veziroglu, 2008). Essa distribuição electrónica deve-se à presença de ferredoxina, que actua como transportadora de electrões em reacções redox biológicas.

Da produção de  $H_2$  por fermentação resultam também outros compostos (subprodutos), cujas concentrações e taxas de produção dependem de parâmetros físico-químicos como a concentração de biomassa e de substrato, o pH e a temperatura do processo (Drapcho *et al.*, 2008).

A fermentação anaeróbia permite a produção de elevados volumes de  $H_2$ , pela utilização de um largo espectro de fontes de carbono como substrato, incluindo subprodutos e resíduos de indústrias agro-alimentares, com ou sem pré-tratamento antes da sua utilização (Das e Veziroglu, 2008). Entre eles podem-se referir os subprodutos da produção de biodiesel, contendo glicerol (Marques *et al.*, 2009), e os hidrolisados obtidos pelo tratamento enzimático da pasta de papel, contendo glucose, xilose e celobiose (Marques *et al.*, 2007).

De seguida apresentam-se vários parâmetros com influência sobre os rendimentos deste processo.

### 1.3.3 Tipo de Substratos

#### ✓ Glucose

A glucose é um dos hidratos de carbono mais comumente utilizado como fonte de carbono, sendo facilmente biodegradável, com elevado potencial energético e encontrando-se na maioria de resíduos agrícolas. Assim, os microrganismos anaeróbios iniciam o processo fermentativo com a conversão da molécula de glucose em duas moléculas de piruvato, pela via glicolítica. Por sua vez, este é

oxidado em acetil-CoA e CO<sub>2</sub>, pela reacção de redução da ferredoxina. A ferredoxina reduzida é oxidada pela hidrogenase que gera Fd(ox) e liberta electrões para produzir H<sub>2</sub> (Das e Veziroglu, 2008).

A reacção global pode ser esquematizada e descrita pelas equações 1 e 2.



### ✓ **Glicerol**

O glicerol tornou-se numa das fontes de carbono mais baratas e abundante da actualidade, uma vez que este é o principal resíduo da produção de biodiesel a nível mundial. O glicerol constitui uma matéria-prima para a produção industrial de inúmeros produtos com interesse comercial. Contudo, quando é proveniente da produção do biodiesel, a glicerina bruta gerada tem um valor comercial muito baixo, essencialmente devido às impurezas que contém. Por isso, quando o objectivo é a sua utilização pela indústria alimentar, cosmética e/ou farmacêutica, torna-se necessário recorrer a processos de purificação, tornando economicamente pouco rentável a utilização desses resíduos. Além disso, este resíduo tem gerado algumas dificuldades nas refinarias, que por dificuldade do seu processamento têm optado pela sua incineração, o que pode conduzir a um problema ambiental pois a incineração do glicerol aumenta a concentração de CO<sub>2</sub> e de NO<sub>x</sub>, que são os principais gases responsáveis pelo efeito de estufa (Sergei *et al.*, 2011). Uma alternativa interessante e inovadora para a utilização deste glicerol de baixa qualidade é a sua aplicação como matéria-prima num processo de *dark fermentation*.

A conversão de glicerol em combustíveis ou produtos reduzidos pode resultar em rendimentos mais elevados do que aqueles obtidos com a conversão de açúcares (Gonzalez *et al.*, 2008).

Mediante todos estes aspectos, o glicerol em bruto apresenta um elevado potencial no que respeita à sua utilização, como substrato, para a produção de combustíveis de alto valor energético, como é o caso do bioH<sub>2</sub>.

## ✓ **Celulose**

A celulose é um imenso recurso renovável, sendo o principal produto da fotossíntese em ambientes terrestres (Guo *et al.*, 2010). Além disso, sendo o constituinte mais abundante das plantas, encontra-se também presente em resíduos agrícolas e efluentes industriais, tais como os provenientes da indústria da pasta de papel (Kapdan *et al.*, 2006). No entanto, a estrutura complexa da celulose e hemicelulose, contidas nos resíduos agrícolas e florestais e efluentes da indústria da pasta de papel, afecta a sua biodegradabilidade, sendo necessário um pré-tratamento, por hidrólise ácida ou enzimática, antes da sua utilização em processos de fermentação, para produção biológica de  $H_2$  (Lakshmidevi e Muthukumar, 2010). A hidrólise conduz à quebra das estruturas complexas, permitindo assim que as bactérias produtoras de  $H_2$  possam facilmente fermentar este tipo de resíduos (Kapdan *et al.*, 2006).

### **1.3.3.1 Efeito do pré-tratamento e concentração de substratos**

No âmbito do conceito da sustentabilidade económica e social, tem-se vindo a desenvolver estudos de produção de bio $H_2$  utilizando, como substrato, resíduos e subprodutos industriais, para comparação de resultados com os obtidos com fontes sintéticas conhecidas, como a glucose, a sacarose, a xilose e o amido. Essa aproximação da realidade revela preocupação por questões ambientais, pois resulta não apenas na diminuição de carga orgânica de um resíduo industrial, como ainda na produção de uma “energia limpa” – o  $H_2$  – a qual pode, posteriormente, ter utilização noutros processos industriais, como os de hidrogenação.

No entanto, o aproveitamento dos resíduos, como substrato, envolve algumas restrições quando se pretende aumentar a sua concentração, com vista à obtenção de maiores rendimentos de produção de  $H_2$ , devido ao possível aumento da concentração de compostos que podem ser inibidores para o processo fermentativo (Wang e Wan, 2009). Desse modo, torna-se imperativo, nestas condições, levar a efeito passos preliminares de caracterização e optimização do processo fermentativo, tendo em conta parâmetros de influência como o pH da fase líquida e a



concentração dos resíduos e/ou do inóculo. A aplicação de pré-tratamentos por acidificação/hidrólise de substratos complexos, como resíduos de rama de milho e da produção de pasta de papel, deve igualmente ser realizada de forma a facilitar o processo metabólico.

### 1.3.4 Microrganismos produtores de hidrogénio

São vários os microrganismos anaeróbios que podem produzir  $H_2$  tendo como fonte de carbono compostos orgânicos contidos em resíduos.

Os microrganismos mesófilos produtores de  $H_2$  por fermentação anaeróbia dividem-se em dois tipos: anaeróbios obrigatórios e anaeróbios facultativos. Os microrganismos anaeróbios obrigatórios são incapazes de utilizar  $O_2$  e sofrem inibição metabólica na sua presença. Entre esses, encontram-se os microrganismos pertencentes ao género *Clostridium*, tal como *C. buytricum*, *C. pasteurianum*, *C. paraputrificum* e *C. bifermentans*. Este tipo de microrganismos produz  $H_2$  durante a fase exponencial de crescimento sendo que, ao atingir a fase estacionária, o metabolismo celular altera-se passando a produzir outros compostos como acetona (Kapdan *et al.*, 2006).

Entre as várias espécies de microrganismos anaeróbios facultativos capazes de produzir  $H_2$  consideram-se as pertencentes ao género *Enterobacteriaceae* como bastante eficientes. O género *Enterobacteriaceae* pertence à classe das *Gammaproteobacteria* que é composta pelas seguintes espécies *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, entre outras. Este tipo de bactéria gram negativa em forma de bastão, com um tamanho que pode variar entre 1 e 5  $\mu m$  de comprimento, são vulgarmente encontradas na água, solo, produtos lácteos e na flora intestinal de animais e humanos (Lederberg e Martin, 2000).

Entre essas espécies, a *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) e a *Enterobacter cloacae* têm sido largamente estudadas, apresentando um rendimento de produção de  $H_2$ , a partir de glucose, de 1,97 mmol de  $H_2$ /g glucose, e de 2,2 mol de  $H_2$ /g glucose, respectivamente (Kapdan *et al.*, 2006).

O género *Enterobacteriaceae* tem a capacidade de metabolizar um largo espectro de substratos, por fermentação anaeróbia. Em todos os casos ocorre produção de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, para a fase gasosa, e de ácidos gordos voláteis e etanol para a fase líquida (Kapdan *et al.*, 2006).

No que respeita à espécie de *E. aerogenes*, a sua capacidade de produzir hidrogénio foi descoberta pelo investigador japonês Tanisho, no princípio da década de 1980, por estirpes isoladas a partir do solo (Zhang *et al.*, 2011). Esta bactéria, como produtora de H<sub>2</sub>, apresenta as seguintes vantagens (Zhang *et al.*, 2011):

- Sendo anaeróbia facultativa, pode crescer na presença de O<sub>2</sub>;
- O seu crescimento não é inibido por uma atmosfera de 100% H<sub>2</sub>;
- Apresenta elevada taxa de crescimento e de produção de H<sub>2</sub>, o que é uma vantagem no que respeita à sua utilização em larga escala;
- Apresenta um rendimento teórico de produção de H<sub>2</sub>, a partir de glucose, de aproximadamente 10 mol H<sub>2</sub>/mol glucose, o qual pode ser considerado como elevado, em processos biológicos.

A produção de H<sub>2</sub> pela bactéria *E. aerogenes* pode ocorrer por duas vias distintas: a via do formato e a via da nicotinamida adenina dinucleótido (NADH).

✓ Via do formato

Pela via do formato, os microrganismos anaeróbios facultativos convertem o piruvato a formato e acetil-CoA, sendo a reacção catalisada pela enzima piruvato-formato-liase (PFL). O formato produzido é depois rapidamente convertido a H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, pela enzima formato-hidrogénio-liase (FHL).

A produção máxima atingida pela via do formato é de 2 mol H<sub>2</sub>/mol glucose.

Segundo Kurukawa e Tanisho, citados por Zhang *et al.* (2011), a adição de formato ou de ácido fórmico pode aumentar a produtividade do processo fermentativo.

✓ Via do NADH

Em vários estudos é demonstrado que a produtividade do H<sub>2</sub> pode ser regulada pela alteração do estado de redução intracelular através da via do NADH, usando

substratos com diferentes estados de oxidação, pela adição externa de NADH ou  $\text{NAD}^+$ , ou pelo bloqueio da via que compete pela fonte de NADH.

Segundo esta via, o rendimento máximo de hidrogénio produzido é de 4 mol  $\text{H}_2$ /mol glucose, porque após a fermentação anaeróbia de 1 mol de glucose são geradas 4 mol de NADH (Zhang *et al.*, 2011).

Um dos principais problemas da via NADH para a produção de  $\text{H}_2$  é a sua limitação termodinâmica, causada pela pressão parcial do  $\text{H}_2$  (Zhang *et al.*, 2011).

O esquema da Figura 1.2 representa o fluxo metabólico da *E. aerogenes* no processo de fermentação anaeróbia da glucose.

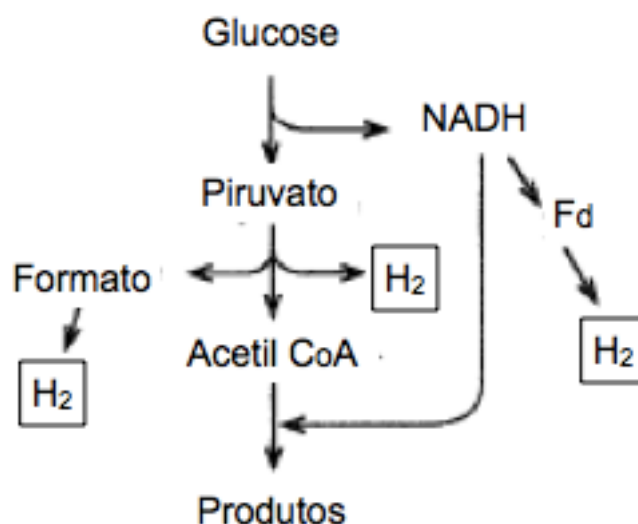


Figura 1.2 - Via metabólica de fermentação anaeróbia da glucose pela bactéria *E. aerogenes* (Adaptado de Tanisho *et al.*, 1998).

### 1.3.5 Efeito das condições operacionais e físico-químicas

A produção de  $\text{H}_2$  por fermentação anaeróbia depende de uma série de parâmetros físico-químicos e condições operacionais como a concentração e tipo de substrato/inóculo, tipo de reactor, temperatura, agitação, pH e a presença e concentração de azoto e iões fosfato e metálicos (Singh *et al.*, 2010). Por isso, a optimização destes parâmetros é muito importante e varia consoante as características dos microrganismos produtores de  $\text{H}_2$ . De seguida discute-se o efeito destes parâmetros na produção biológica de  $\text{H}_2$ .

#### **1.3.5.1 Temperatura**

A temperatura é um dos parâmetros operacionais que mais influencia o processo de fermentação para a produção de bioH<sub>2</sub>, pois afecta os processos biológicos a nível de crescimento celular e enzimático.

Foi demonstrado que numa gama apropriada, o aumento da temperatura pode conduzir a um aumento da produção de H<sub>2</sub>. Assim, os microrganismos produtores de H<sub>2</sub> podem desenvolver o seu metabolismo em diferentes gamas de temperatura sendo, com base nisso, classificados como mesófilos (25 a 40°C), termófilos (40 a 65°C) e extremófilos (> 80°C) (Singh *et al.*, 2010).

#### **1.3.5.2 pH**

Outro factor muito importante para o processo de produção de H<sub>2</sub>, por via biológica, é o pH, pois altera a actividade do enzima hidrogenase, bem como os percursos metabólicos das bactérias produtoras de H<sub>2</sub>, podendo diminuir a sua concentração. Vários autores demonstraram que valores de pH entre 6-7 conduzem a rendimentos mais elevados em H<sub>2</sub> (Wang e Wan, 2009). Por outro lado, segundo Singh *et al.* (2010), o pH óptimo para a produção de H<sub>2</sub> situa-se ente os 5,5-7,0, observando-se que para valores inferiores a 5 e superiores a 7 a produção de H<sub>2</sub> reduz-se significativamente por influência negativa sobre a actividade da enzima hidrogenase. Além disso, tem também sido referido que o pH baixo facilita a formação de ácidos gordos voláteis (AGV), os quais desestabilizam a capacidade das células manterem o pH interno, tendo como resultado uma redução significativa do nível de ATP intracelular e a inibição do consumo de substrato.

#### **1.3.5.3 Efeito da presença de azoto e de iões fosfato e metálicos**

Num processo fermentativo, a presença de azoto é importante para a existência/formação de proteínas e ácidos nucleicos e metabolismo enzimático. Qualquer um desses compostos é de grande importância para o crescimento das

bactérias produtores de  $H_2$ . Portanto, uma concentração apropriada de azoto beneficiará o rendimento global do processo (Wang e Wan, 2009).

No que respeita aos iões fosfato, além do valor nutricional realça-se a capacidade de efeito tampão que exerce com vantagem para o desenvolvimento do processo. Por isso, uma concentração apropriada de iões  $PO_4^{2-}$  pode ser essencial para a evolução do metabolismo celular durante o processo (Wang e Wan, 2009).

Quanto à presença de iões metálicos como  $Fe^{2+}$ , esses são essenciais para o bom desempenho da enzima hidrogenase e, portanto, para a obtenção dos melhores rendimentos de produção  $H_2$ . No entanto, em concentrações elevadas pode ocorrer inibição da actividade da bacteriológica (Wang e Wan, 2009).

#### 1.3.5.4 Tipo de reactores

As características e parâmetros operacionais dos reactores utilizados para a produção de  $bioH_2$ , por fermentação anaeróbia, variam consoante o tipo de estudo laboratorial a realizar.

Assim, as características dos reactores podem variar entre o pequeno vaso de reacção selado, o reactor ASBR (*Anaerobic Sequencing Batch Reactor*) e o reactor do CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*).

O vaso de reacção selado destina-se ao estudo da produção de  $H_2$  em regime descontínuo, para a obtenção de dados referentes à produção de  $H_2$  durante um determinado período de tempo, com um aumento significativo da pressão parcial do  $H_2$  no seu interior e à redução significativa da concentração de substrato.

O reactor ASBR opera em modo semi-contínuo, sendo o seu uso bastante generalizado a nível laboratorial. A grande retenção de biomassa no reactor e a capacidade de diferenciação entre o tempo de retenção de sólidos (TRS) e o tempo de retenção hidráulica (TRH) são tidos como pontos fortes deste tipo de reactor (Won e Lau, 2011).

Por último, os reactores do tipo CSTR são em geral aplicados para o estudo da produção de  $H_2$  em regime contínuo, sendo normalmente utilizado nos processos industriais. Este tipo de reactor está em constante funcionamento, não necessitando assim de paragens para a alimentação e remoção do efluente fermentado, sendo

que este processo é assegurado por válvulas de entrada e saída do efluente. O reactor encontra-se equipado com um rotor e um sistema de agitação, que se destina à homogeneização da mistura da biomassa e substrato. Uma das grandes desvantagens do uso deste tipo de reactor, é a saída de biomassa com o efluente sob risco de ocorrer *washout* da biomassa. Por isso, a imobilização da biomassa, pela formação de grânulos ou biofilme, surge como uma alternativa ao funcionamento convencional do CSTR, conseguindo-se assim manter concentrações elevadas de biomassa no interior do reactor (Wang e Wan, 2009).

A Figura 1.3 esquematiza as partes constituintes de um reactor CSTR.

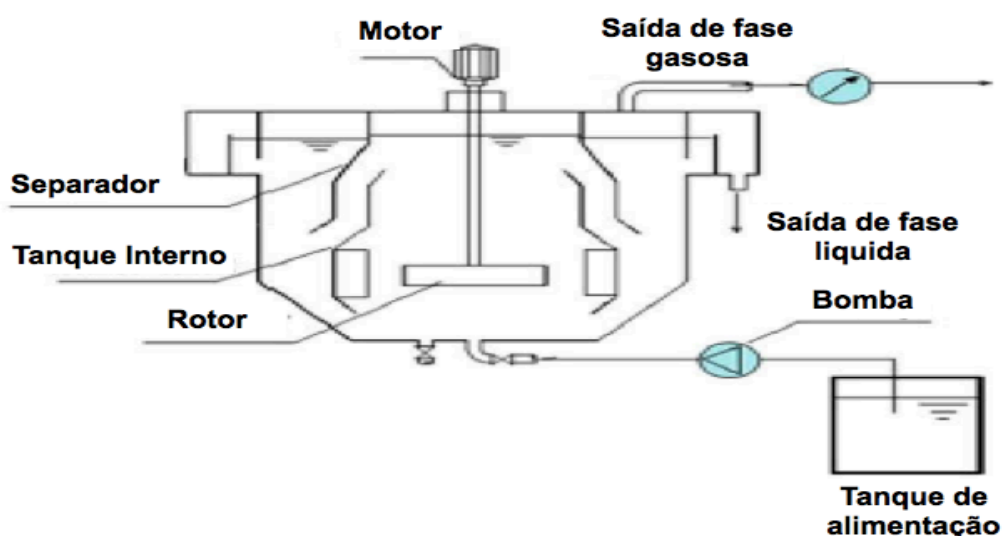


Figura 1.3 - Diagrama esquemático do reactor CSTR (Adaptado de Ding *et al.*, 2010).

## **Capítulo 2: Materiais e Métodos**





## 2.1 Materiais

### 2.1.1 Microrganismo

Neste estudo utilizou-se uma estripe da bactéria *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*) para a produção de H<sub>2</sub> por fermentação anaeróbia. A sua manutenção em laboratório foi levada a cabo por repicagem, em condições de assépsia, em tubos de ensaio contendo meio nutriente sólido inclinado (*slant*), preparado por dissolução a quente de uma solução de 40 g/L da mistura caso-Agar (*Merck*) em água bidestilada (meio TSA).

As culturas foram conservadas a 4°C e repicadas aquando do início de cada experiência.

### 2.1.2 Meio de Crescimento

Antes de cada ensaio, as bactérias foram previamente crescidas num meio líquido cuja composição se apresenta na Tabela 2.1, numa incubadora com agitação orbital, nas seguintes condições: T=30°C e 150 rpm. Esta cultura foi designada por pré-inóculo.

Tabela 2.1 - Composição do meio de crescimento para a bactéria *E. aerogenes*

Reagente	Concentração (g/L)
Peptona	20
NaCl	5

### 2.1.3 Meio de Fermentação

Para a realização dos ensaios de produção de  $\text{bioH}_2$  utilizou-se um meio complexo (designado por meio de fermentação), cuja composição se encontra descrita na Tabela 2.2 e ao qual se adicionou, em cada ensaio, o substrato a estudar, numa concentração final de 10 g/L. Este meio foi também utilizado por outros autores, para estudos desenvolvidos na área de produção de  $\text{bioH}_2$  a partir de subprodutos da produção de biodiesel, como por exemplo o glicerol (Ito *et al.*, 2005).

Tabela 2.2 - Composição do meio de fermentação.

Reagente	Concentração (g/L)	Grau de pureza (%)	Marca
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7,0	98	Merck
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5,5	98	Baker and Adamson
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0	99	Riedel-de Haën
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,5 \times 10^{-1}$	97	Merck
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,1 \times 10^{-2}$	98	Merck
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,2 \times 10^{-1}$	97	Merck
Ácido Nicotínico	$2,0 \times 10^{-3}$	98	Merck
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	$1,72 \times 10^{-4}$	99	Merck
$\text{NiCl}_2$	$2,0 \times 10^{-5}$	98	Merck
Tryptona	5,0	-	Becton Dickinson
Extracto de levedura	5,0	-	Biokon Diagnostics
Elementos Traço			
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$5,0 \times 10^{-1}$	97	Riedel-de Haën
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$1,0 \times 10^{-1}$	98	Merck
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	$5,0 \times 10^{-1}$	99	Panreac
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$1,0 \times 10^{-2}$	97	AnalaR
$\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$1,0 \times 10^{-3}$	99	Merck

#### 2.1.4 Substratos

Neste estudo avaliou-se a eficiência de três resíduos com diferentes proveniências, os quais foram utilizados como substratos para a produção de H<sub>2</sub> por via fermentativa: a) subprodutos da produção de biodiesel, contendo 86% (m/m) de glicerol (glicerol em bruto); b) hidrolisado obtido a partir de resíduos da produção da pasta de papel, contendo glucose (33,8 g/L), xilose (6,8 g/L) e celobiose (5,5 g/L) (Marques *et al.*, 2007); c) biomassa microalgal (microalgas da espécie *Scenedesmus obliquus*).

#### 2.1.5 Equipamento

No decurso do trabalho laboratorial foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Incubadora com agitação orbital, modelo New Brunswick Scientific CO. Inc Edison, N.J. U.S.A.;
- Incubadora com agitação orbital, modelo Lab Line instruments, Inc.;
- Câmara de aquecimento P-SELECTA Hotcold-GL 2101507 com temperatura regulada;
- Espectrofotômetro de varrimento HITACHI U2000;
- Cromatógrafo Gasoso VARIAN, modelo CP 3800;
- Integrador Shimadzu modelo C-R5A;
- Cromatógrafo Gasoso VARIAN modelo 430-GC;
- Cromatógrafo Gasoso HP modelo 5890;
- HPLC Lachrom (Merck Hitachi);
- Balança analítica de bancada Mettler Toledo modelo AB204-S;
- Balança de bancada Mettler modelo PM4600;
- Medidor de pH WTW, modelo pH 340-A;
- Autoclave VITEQUIPA;
- Hotte Captain modelo Cruma;
- Vortex modelo VELP Scientific;
- Centrífuga Beckman modelo J-25I;
- Centrífuga de bancada Eppendorf AG modelo 5415D;

- Centrífuga de bancada Thermo Scientific modelo Heraeus multifuge 3SR<sup>+</sup>;
- Placa de agitação magnética Fisher Bioblock Scientific modelo 10517;
- Estufa Memmert;
- Bomba Peristáltica Ecoline;
- Controlador de gases Schlumberger;
- Moinho de esferas Retsch modelo MM 400;

### 2.1.6 Montagem experimental

Para todos os substratos e em função dos objectivos do trabalho, os ensaios laboratoriais de produção de bioH<sub>2</sub> foram levados a cabo nos seguintes sistemas:

- Reactores *Mariotte* - Frascos com volume total de 606,0 mL, ligados a colunas de *Mariotte*, em câmara a 30°C e agitação magnética (Figura 2.1). Estes reactores foram utilizados na determinação dos tempos de equilíbrio dos processos de produção de bioH<sub>2</sub> e na avaliação da metodologia de inoculação.

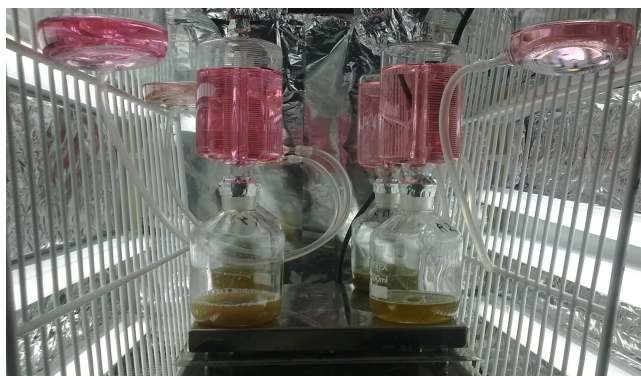


Figura 2.1 - Montagem experimental utilizada para a produção de H<sub>2</sub>, por via biológica, em reactores *Mariotte* com agitação magnética, na câmara de aquecimento com temperatura regulada a 30°C – Determinação do tempo de equilíbrio do processo e avaliação da metodologia de inoculação

- Reactores encapsulados - Frascos com volume total de 159,5 mL, selados com rolhas de butilo e encapsulados com cápsulas de alumínio. Estes reactores foram colocados numa incubadora com agitação orbital e

temperatura controlada a 30°C. Estes sistemas foram utilizados na determinação dos perfis de produção de H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ácidos e etanol e de consumo de substrato, ao longo do tempo.



Figura 2.2 - Reactor encapsulado – determinação dos perfis de produção de H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ácidos e etanol e de consumo de substrato, ao longo do tempo.

As experiências foram planeadas com base em condições operacionais já estudadas anteriormente (Marques *et al.*, 2009; Ricardo, 2009), mas também com alteração de alguns parâmetros ou procedimentos, com vista a desenvolver-se novas metodologias quanto ao tipo de inoculação e de recolha da fase gasosa para análise.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Crescimento da estirpe da bactéria *Enterobacter aerogenes*

Para se realizar a produção laboratorial da bactéria *Enterobacter aerogenes*, em meio líquido, preparou-se um meio de crescimento com a composição indicada na Tabela 2.1. Antes de se ter efectuado a inoculação das bactérias, o meio foi esterilizado em autoclave nas seguintes condições: T=121°C e P=2 bar, durante 20 minutos.

A produção das células de *Enterobacter aerogenes* foi levada a cabo tendo em conta dois objectivos distintos:

- a) Determinação da curva de crescimento bacteriano ao longo do tempo e da recta de peso seco (p.s.) em função da densidade óptica (D.O.). Para esse efeito inocularam-se dois *erlenmeyers* de 500 mL contendo, cada um, 250 mL do meio de crescimento, com uma ansada de bactérias retirada de uma rampa de conservação em condições de assépsia.

Ambos os *erlenmeyers* foram incubados nas seguintes condições: T=30 °C e agitação orbital de 150 rpm. Num dos *erlenmeyers* recolheram-se amostras ao longo do tempo, para leitura da D.O. da suspensão celular, a um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 640 nm (obtenção da curva de crescimento da biomassa).

No outro *erlenmeyer*, após 24 horas de incubação, recolheu-se toda a biomassa bacteriana produzida, por centrifugação a 10000 rpm, durante 10 min, a 5°C. A biomassa recolhida foi ressuspensa em igual volume de água bidestilada – cultura designada por solução *stock*. A partir desta solução preparam-se 6 diluições, (1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50) para leitura da D.O. ( $\lambda$ =640 nm) e determinação do p.s. correspondente, para obtenção da recta pretendida. A determinação do p.s. encontra-se descrita na secção 2.3.1.

- b) Obtenção do pré-inóculo (PI) para inoculação do meio de fermentação. O PI foi obtido por incubação do meio de crescimento (Tabela 2.1), inoculado com as bactérias, a T=30°C e 150 rpm, durante cerca de 15 horas. A partir do PI, as células foram inoculadas no meio de fermentação (Tabela 2.2) e incubadas a T=30°C e com uma agitação orbital de 150 rpm (reactores encapsulados) ou sob agitação magnética (reactores *Mariotte*), tendo em conta os objectivos pretendidos. A inoculação foi realizada numa *hotte* com aspiração, em condições de assépsia e com borbulhamento de azoto na fase líquida, durante cerca de 2 min, para se atingir uma atmosfera anaeróbia.

### **2.2.2 Metodologias de inoculação e de recolha da fase gasosa produzida, nos reactores encapsulados, para análise**

Numa primeira fase do trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da metodologia de inoculação e da concentração inicial de bactérias sobre os rendimentos do processo. Estes estudos foram realizados em reactores *Mariotte*, utilizando como substrato os subprodutos da produção de biodiesel (86% m/m de glicerol), para comparação com resultados obtidos anteriormente e por esse ter demonstrado não causar inibições sobre o desempenho das bactérias, mesmo quando foi adicionado ao meio de fermentação em quantidade correspondente a uma concentração inicial de glicerol superior a 20 g/L (Marques *et al.*, 2009; Ricardo, 2009).

Quanto à metodologia de inoculação, compararam-se dois procedimentos, nomeadamente a adição directa de volumes do PI correspondentes a 1 e 10% (v/v) do volume do meio de fermentação e a adição de um dado volume de solução concentrada de bactérias, obtida a partir do PI. No que respeita a este último, a suspensão celular do PI foi inicialmente centrifugada a 10000 rpm, durante 10 minutos, a 5°C, tendo sido posteriormente ressuspensa em água bidestilada esterilizada, para lavagem das bactérias, sendo logo de seguida sujeita a nova centrifugação. Após a segunda centrifugação, a biomassa foi então concentrada num determinado volume de água bidestilada esterilizada, a fim de se obter uma suspensão de células com concentração apropriada à inoculação do p.s. pretendido no meio de fermentação. O volume de água a ressuspender as bactérias foi calculado com base na recta D.O. vs p.s. previamente determinada.

No que respeita à metodologia de recolha da fase gasosa produzida nos reactores encapsulados, compararam-se dois procedimentos:

- a) Recolha directa da fase gasosa por uma seringa introduzida no *headspace* (HS) e análise por cromatografia;
- b) Despressurização do sistema por uma seringa introduzida no *headspace* (HS) do reactor, seguida da recolha de amostra da fase gasosa, para avaliação dos teores em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> por cromatografia gasosa. Neste caso, o volume considerado para os cálculos correspondeu ao somatório do volume obtido por deslocação do êmbolo da seringa com o volume do HS do reactor.

### 2.2.3 Produção de hidrogénio por via biológica (bioH<sub>2</sub>)

Os ensaios de produção de H<sub>2</sub> por fermentação anaeróbia, a partir dos três substratos em estudo, foram realizados em diferentes condições operacionais, consoante os objectivos a atingir. Contudo, em todos os ensaios foi mantida a relação entre o volume total do reator e o volume da fase líquida, correspondente ao volume da fase gasosa acima do líquido (*HS*). O volume do *HS* foi sempre igual a 5/6 do volume total do reator, com base num estudo realizado anteriormente sobre o efeito desse parâmetro no rendimento do processo (dados ainda não publicados).

- ✓ Determinação do tempo de equilíbrio do processo de produção de bioH<sub>2</sub> – Estas experiências foram realizadas para todos os substratos, na câmara de aquecimento, sob uma temperatura controlada de 30°C, em reactores com agitação magnética (≈ 200 rpm) ligados a uma coluna de *Mariotte*. O volume da fase gasosa produzida, ao longo do tempo, correspondeu ao volume de líquido corado (NaCl 20% v/v, 2-3 gotas de HCl e de alaranjado de metilo) deslocado no interior da coluna.

Quando o sistema atingiu o equilíbrio, recolheu-se uma amostra da fase gasosa no topo da coluna de *Mariotte*, para determinação dos teores em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, por GC.

O volume total de fase gasosa produzida durante o processo, foi calculado pelo somatório do volume de líquido deslocado na coluna, o volume da *HS* do reator e o volume dos restantes espaços vazios do sistema.

- ✓ Obtenção dos perfis de produção/consumo e determinação da velocidade inicial de produção de bioH<sub>2</sub> – Estes estudos foram levados a cabo em frascos selados com rolhas de butilo e encapsulados com cápsulas de alumínio, em incubadora com agitação orbital (200 rpm) e T=30°C (Figura 2.2). Para efeitos da determinação do volume total de fase gasosa produzido e da sua composição procedeu-se da forma descrita na secção 2.2.2.

Para todos os ensaios realizados, o meio de fermentação, contendo o substrato na concentração pretendida, foi previamente esterilizado em autoclave (T=121°C; P=2 bar; 20 minutos). As condições de inoculação do meio de fermentação decorreram como descrito na secção 2.2.1, alínea *b*.



- ✓ Estudos do efeito da presença de microalgas no PI e do efeito da moagem das algas
  - Estes estudos foram realizados na câmara de aquecimento com temperatura regulada a 30°C, em reactores com agitação magnética ( $\approx 200$  rpm), ligados a uma coluna de *Mariotte* (coluna graduada).

Para o estudo do efeito da presença de microalgas no PI, foram aplicados diferentes períodos de autoclavagem, de 15 e 30 min, do PI, na ausência e presença de 1 g/L de microalgas, e sobre o meio de fermentação, na presença de 10 g/L de microalgas.

O efeito da moagem de microalgas, sobre o rendimento do processo, foi avaliado por comparação de resultados obtidos para as microalgas nos dois diferentes estados morfológicos.

Em cada conjunto de ensaios, introduziu-se um reactor sem biomassa, nas mesmas condições operacionais, para controlo (ensaio em branco).

## 2.3 Métodos Analíticos

### 2.3.1 Determinação do peso seco da biomassa

A caracterização das bactérias, a serem utilizadas como inóculo, foi realizada em termos da correlação entre a D.O. de uma suspensão celular e o p.s. correspondente em  $\text{g}_{\text{Biomassa seca}}/\text{L}_{\text{Suspensão}}$ , para soluções com diferentes concentrações de bactérias.

Para a determinação dos pesos secos utilizaram-se membranas de nitrato de celulose (com uma porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e um diâmetro de 47 mm, da marca Whatman). Estas membranas foram previamente secas numa estufa a 80°C, durante cerca de 16 horas.

Assim, a partir de uma solução *stock* de bactérias obtida conforme descrito na secção 2.2.1, alínea a, prepararam-se 6 diluições (1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50). De cada diluição retirou-se 10 mL de suspensão celular e procedeu-se à sua filtração, sob vácuo. A biomassa retida foi depois lavada com igual volume de água bidestilada e as membranas colocadas na estufa a 80°C, durante 16 horas.

Após pesagem das membranas com a biomassa seca efectuaram-se cálculos, para determinação dos respectivos pesos secos. Os valores de peso seco foram determinados de acordo com a Eq. 1:

$$\chi = \frac{1000 \times (\beta - \alpha)}{\gamma} \quad (1)$$

em que:

$\alpha$  - peso do filtro (g);

$\beta$  - peso do filtro após filtração e secagem (g);

$\gamma$  - volume de suspensão filtrada (L);

$\chi$  - peso seco da biomassa em suspensão (g/L).

Os valores considerados no presente trabalho corresponderam à média dos resultados obtidos para um triplicado, com um desvio padrão inferior a 10%.

### 2.3.2 Determinação dos teores em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> na fase gasosa

Após cada ensaio, recolheram-se amostras do HS das colunas de *Mariotte* ou dos reactores encapsulados, para determinação dos conteúdos em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> na fase gasosa, por cromatografia gasosa (GC). Para tal, utilizaram-se dois cromatógrafos calibrados para diferentes intervalos de teores em H<sub>2</sub>, nomeadamente:

- **Para teores de H<sub>2</sub> até 15%** - Cromatógrafo gasoso VARIAN modelo 430-GC com detector de condutividade térmica TCD e uma coluna de sílica fundida com CP-MolecularSieve de 5 Å, com 30 m e diâmetro interno de 0,53 mm e espessura de 15 µm. A temperatura do injectores e da coluna foi de 80°C e a do detector de 120 °C. Utilizou-se argon como gás de arrasto.
- **Para teores de H<sub>2</sub> superiores a 15%** - Cromatógrafo de fase gasosa VARIAN, modelo CP3800, com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi uma Porapak Q, de 3 m x 1/8" e o gás de arrasto foi o azoto.

### **2.3.3 Determinação do conteúdo em ácidos gordos voláteis (AGV's), etanol e açúcares na fase líquida**

Os teores em AGV's, açúcares e etanol, na fase líquida, foram determinados por cromatografia líquida num HPLC *Lachrom* (Merck Hitachi) equipado com um injetor automático L7200, uma bomba L7100, um forno L7350, um detector de índice de refração L7490 e uma coluna *Aminex HPX87H*. As análises decorreram a 50°C e as amostras foram eluídas com uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, filtrado (filtros *Supock 200 Pall Life Sciences* – polietersulfona hidrofílica - com 47 mm de diâmetro e 0,2 µm de tamanho de poro), a um fluxo de 0,4 mL/min.



## **Capítulo 3: Discussão de Resultados**



### 3.1 Produção das células de *Enterobacter aerogenes*

Inicialmente procedeu-se à avaliação de parâmetros físico-químicos relacionados com a produção laboratorial da estirpe bacteriana a utilizar no presente trabalho. Pretendeu-se com este estudo obter informação acerca do perfil de crescimento das bactérias, nomeadamente do período correspondente à sua fase exponencial. Essa informação foi fundamental para que a inoculação do meio de fermentação, a partir do PI, ocorresse nas melhores condições de viabilidade das células, isto é, nas condições em que os seus mecanismos de transporte se encontravam em pleno estado de actividade, em termos de utilização de nutrientes, incluindo a fonte de carbono.

#### 3.1.1 Crescimento da biomassa

Para se estudar o perfil de crescimento das células de *E. aerogenes*, após inoculação do meio de crescimento e incubação a  $T=30^{\circ}\text{C}$  e 150 rpm, recolheram-se amostras da suspensão celular, ao longo do tempo, para determinação da densidade óptica (D.O.) do meio, a 640nm. Na Figura 3.1 apresenta-se a curva de crescimento da bactéria, tendo por base os valores da D.O.

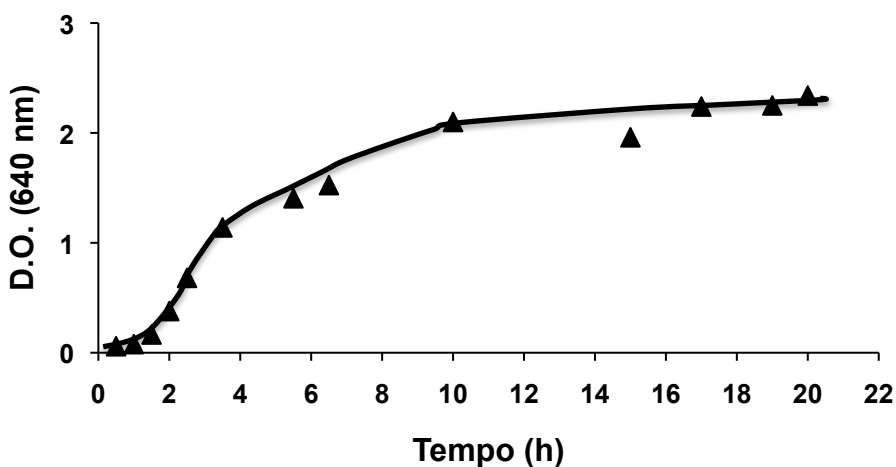


Figura 3.1 - Curva de crescimento da estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATTCC 13048 *Sputum*), em meio líquido (peptona, 20 g/L e NaCl, 5 g/L), numa incubadora com agitação orbital de 150 rpm, a  $30^{\circ}\text{C}$ .

Observou-se que o crescimento das bactérias seguiu um perfil *sigmoidal*, sendo possível identificar três fases do crescimento: a fase de latência (entre as 0-2h), a fase exponencial (entre as 2-6 h) e a fase estacionária (entre as 6-20h). Com base neste comportamento, a recolha de biomassa do pré-inóculo, para inoculação do meio de fermentação, ocorreu, em todos os ensaios de produção de H<sub>2</sub>, após cerca de 13-14 h de crescimento em água de peptona, nas condições já referidas na secção 2.2.1, alínea *b*.

### **3.1.2 Determinação da recta de calibração densidade óptica (D.O.) vs peso seco (p.s.)**

O cálculo do peso seco de biomassa, isto é, da sua concentração expressa em  $\text{g}_{\text{Biomassa seca}}/\text{L}_{\text{Suspensão celular}}$ , é o método mais assertivo para determinação do crescimento da biomassa ao longo do tempo. Contudo, a sua aplicabilidade apresenta desvantagens, nomeadamente quanto à rapidez de obtenção de resposta e ao custo associado às membranas filtrantes. Assim, de forma a ultrapassar estas limitações, aplicou-se um modelo de regressão linear em que as duas variáveis relacionadas com a concentração de biomassa - D.O. e p.s. - foram correlacionadas de forma a obter-se uma recta (*recta de calibração*).

Neste trabalho, a determinação da recta de calibração D.O. vs p.s. foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 2.3.1. Os valores obtidos para as leituras de D.O. e para os p.s. correspondentes encontram-se na Tabela 3.1. Com base na Tabela 3.1 construiu-se a recta de calibração apresentada na Figura 3.2, a qual pode ser representada pela equação  $y=3,393x + 0,1785$ , com um valor de coeficiente de correlação de  $r^2=0,9993$ , o que indica uma elevada correlação entre as duas variáveis em causa.



Tabela 3.1 – Valores de D.O. e p.s. correspondentes para diferentes suspensões celulares da bactéria *Enterobacter aerogenes*, preparadas a partir de uma solução *stock*.

Diluição	D.O.	p.s. [g <sub>Biomassa</sub> /L <sub>Suspensão</sub> ]
Solução <i>stock</i> (1:1)	3,09	0,86
1:2	1,47	0,38
1:5	0,67	0,15
1:10	0,60	0,11
1:20	0,18	0,01

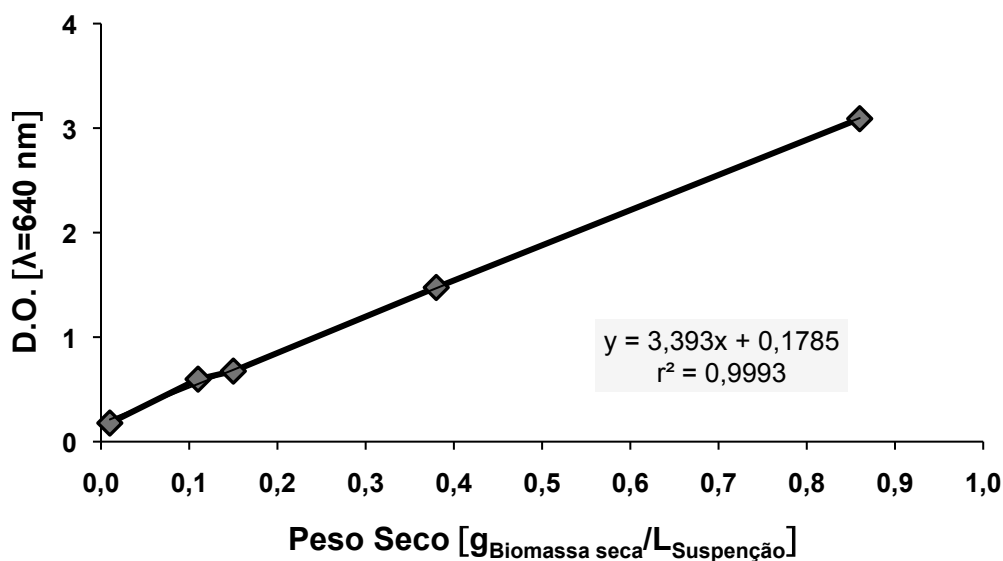


Figura 3.2 - Recta de calibração D.O. vs p.s. obtida para o crescimento de células de *E. aerogenes* em água de peptona, em condições de T=30°C e 150 rpm.

A partir da equação da recta passou a ser possível calcular-se de forma expedita o p.s. do PI, a partir da leitura da D.O. da suspensão celular e, por conseguinte, a concentração inicial de bactérias inoculada, em cada ensaio.

## 3.2 Produção de bioH<sub>2</sub> a partir de substratos complexos

O objectivo desta fase do trabalho foi estudar a viabilidade da produção de bioH<sub>2</sub> pela bactéria *E. aerogenes*, por fermentação anaeróbia, a partir de diferentes substratos complexos, nomeadamente, subprodutos da produção de biodiesel contendo glicerol (86% m/m), hidrolisado enzimático de resíduos provenientes de uma indústria de produção de pasta de papel, contendo glucose (33,8 g/L), xilose (6,8 g/L) e celobiose (5,5 g/L) e biomassa microalgal (*Scenedesmus obliquus*).

Os procedimentos que envolveram a preparação dos ensaios microbiológicos, desde a preparação do PI às condições de inoculação, variaram consoante os objectivos e encontram-se descritos nas secções 2.2.1, alínea *b*, e 2.2.2.

De seguida apresentam-se os resultados obtidos e a sua interpretação. Todos os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três experiências independentes, com um desvio padrão inferior a 10% dos valores registados.

### 3.2.1 Optimização de metodologias

Com vista a estabelecer-se/optimizar-se os procedimentos a adoptar na realização do trabalho, estudou-se inicialmente o efeito de dois parâmetros influentes no rendimento do processo e no tratamento dos resultados obtidos, nomeadamente, as metodologias de inoculação e as metodologias de recolha da fase gasosa produzida nos reactores encapsulados.

Para a realização destes ensaios seleccionou-se, como substrato, os subprodutos da produção de biodiesel (86% m/m de glicerol).

#### 3.2.1.1 Inoculação do meio de fermentação

Com o objectivo de se estudar a influência da adição do inóculo ao meio de fermentação e da sua concentração inicial sobre os rendimentos do processo, compararam-se duas metodologias, nomeadamente a adição directa de um volume

do PI correspondente a 1 e a 10% (v/v) do volume do meio de fermentação e a adição de uma solução concentrada de bactérias, obtida a partir do PI, de forma a inocular-se uma concentração superior de bactérias.

Estes ensaios foram realizados numa câmara com temperatura controlada a 30°C e agitação magnética, em reactores ligados a uma coluna de *Mariotte*, para ter melhor percepção do tempo necessário para atingir o equilíbrio do processo.

Com base na D.O. do pré-inóculo e na equação da recta de crescimento apresentada na secção 3.1.2, calculou-se a concentrações de bactérias inoculada para cada condição experimental. Essas concentrações foram de 0,01 e 0,10 g<sub>Biomassa seca</sub>/L, quando se adicionou um volume de PI correspondente a 1 e 10% (v/v), respectivamente, do volume do meio de fermentação, e 0,5 g<sub>Biomassa seca</sub>/L, quando se adicionou a solução concentrada de bactérias.

A Tabela 3.2 apresenta os rendimentos de produção de H<sub>2</sub> obtidos para cada um dos ensaios com as diferentes concentrações iniciais de biomassa.

Tabela 3.2 - Rendimentos de produção de H<sub>2</sub> ( $\eta$ ) obtidos para diferentes concentrações de bactérias inoculadas, segundo diferentes metodologias. Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética,  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ , [Glicerol]<sub>i</sub>=10 g/L.

[Biomassa] [g <sub>Biomassa seca</sub> /L <sub>Suspensão</sub> ]	$\eta$ [mL H <sub>2</sub> /g glicerol <sub>cons</sub> ]	Percentagem de variação (%)
0,01	352,00	0
0,10	378,00	+7,4
0,50	397,00	+12,8

Observando a Tabela 3.2 verifica-se que a variação da concentração inicial do inóculo não conduziu a diferenças significativas de resultados quando se comparam os valores obtidos para a situação em que se inoculou 0,1 e 0,5 g<sub>Biomassa seca</sub>/L. Estes resultados conduziram à decisão de inocular os reactores com 10% (v/v) de PI (0,10 g<sub>Biomassa seca</sub>/L), em todas as experiências posteriores, tendo em conta o menor número de passos envolvidos no procedimento de inoculação e o menor gasto

energético associado, já que neste caso não é necessário centrifugar o PI para concentrar a biomassa.

### 3.2.1.2 Recolha da fase gasosa dos reactores encapsulados

Nesta fase do trabalho pretendeu-se comparar os resultados obtidos tendo em conta dois procedimentos de recolha da fase gasosa dos frascos encapsulados, nomeadamente, recolha sob pressão e após despressurização do frasco.

A razão pela qual se realizou este estudo teve por objectivo estabelecer-se qual a metodologia mais apropriada para a recolha dos gases. Sendo o reactor encapsulado um sistema fechado, poderá ocorrer estratificação dos gases no seu *headspace*, podendo a recolha da amostra não ser representativa da composição real da fase gasosa, em termos de percentagens presentes de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.

As metodologias levadas a cabo assim como a forma de realização dos cálculos para obtenção dos volumes de gases produzidos, de acordo com as condições de recolha, encontram-se descritas na secção 2.2.2 do capítulo *Materiais e Métodos*.

Na Tabela 3.3 apresenta-se a composição do gás recolhido no headspace dos reactores encapsulados, em função da metodologia de recolha da amostra de gases.

Tabela 3.3 - Volumes de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, obtidos pela recolha de fase gasosa no topo e no meio da *headspace* em reactores encapsulados sob pressão e após despressurização. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ , [Biomassa]<sub>i</sub>=0,1 gBiom. seca/LMeio de ferment, [Glicerol]<sub>i</sub>=10 g/L.

Condições de pressurização	Recolha no topo do <i>headspace</i> do reactor			Recolha no centro do <i>headspace</i> do reactor		
	H <sub>2</sub> (mL)	CO <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> (mL)	CO <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
<b>Pressurizado</b>	14,20	2,90	4,90	52,20	35,20	1,50
<b>Despressurizado</b>	54,00	30,70	1,80	53,40	32,00	1,70

Observando a Tabela 3.3 verifica-se claramente que, sob pressão, os volumes de  $H_2$  e  $CO_2$  foram significativamente diferentes quando a recolha da amostra da fase gasosa foi realizada no topo do *headspace* do reactor ou no centro da *headspace*.

Nas condições em que o reactor se encontrava pressurizado, verificou-se ainda que a fracção  $H_2/CO_2$  foi significativamente superior no topo do reactor ( $H_2/CO_2=4,9$ ) comparativamente à que foi obtida quando a recolha da fase gasosa foi realizada no centro do *headspace* ( $H_2/CO_2=1,5$ ).

Contudo, quando a amostra foi recolhida no centro do *headspace* do reactor obtiveram-se valores muito similares, para todos os parâmetros avaliados, quer o sistema estivesse sob pressão ou quer estivesse despressurizado.

Desta forma, concluiu-se que estando o sistema pressurizado ou despressurizado, a recolha da amostra de fase gasosa deveria ser sempre realizada no centro da *headspace*, para que os teores em  $H_2$  e  $CO_2$  pudessem ser considerados como representativos da composição do biogás produzido. Posteriormente a esta fase do trabalho, decidiu-se adoptar como metodologia de recolha do gás, a despressurização prévia dos reactores antes da recolha da amostra gasosa destinada à análise por GC.

### 3.3 Efeito do tipo de substrato

Após o estabelecimento da concentração inicial do inóculo e da metodologia de recolha da amostra da fase gasosa produzida, pretendeu-se de seguida testar a viabilidade de aplicação deste processo microbiológico na produção de  $bioH_2$ , a partir de outras fontes de carbono, além dos subprodutos da produção de biodiesel. Como se referiu anteriormente, foi testado um hidrolisado de pasta de papel e biomassa microalgal.

Com cada um dos substratos orgânicos, realizaram-se ensaios para se efectuar a avaliação de parâmetros importantes para o processo, como o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio e a velocidade de produção de  $bioH_2$ . Em simultâneo, procedeu-se à análise qualitativa e quantitativa dos compostos

presentes na fase líquida resultante da fermentação, por HPLC, com vista a uma melhor interpretação do rendimento associado a cada uma das fontes de carbono. Apresentam-se seguidamente os resultados obtidos para cada um dos parâmetros e substratos estudados.

### **3.3.1 Determinação do tempo de equilíbrio do processo**

Os ensaios de determinação do tempo de equilíbrio do processo foram realizados em reactores ligados a colunas de *Mariotte*, para melhor percepção do momento em que o sistema deixava de produzir gases, a  $T=30^{\circ}\text{C}$  e com agitação magnética. As concentrações iniciais de substrato e de bactérias inoculadas foram, respectivamente, de 10 e 0,1 g/L (10% (v/v) de PI). Todos os procedimentos envolvidos na preparação dos ensaios e as condições de inoculação encontram-se descritos na secção 2.2.2.

#### **3.3.1.1 Subprodutos da produção de biodiesel (glicerol em bruto)**

Nestes ensaios, os subprodutos da produção de biodiesel foram adicionados ao meio de fermentação, sem autoclavagem prévia e em volume suficiente para que a concentração final em glicerol fosse de aproximadamente 10 g/L.

Após um período de 8 h de incubação, deixou de haver produção de fase gasosa, isto é, o equilíbrio do processo foi atingido. Nessa fase recolheu-se uma amostra da fase gasosa, para determinação dos teores em  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$ , por cromatografia gasosa (Tabela 3.4), e da fase líquida para determinação dos teores em ácidos (AGV's) e etanol, por HPLC (Tabela 3.5).

A Tabela 3.4 mostra claramente que a estirpe bacteriana, utilizada neste trabalho, mostrou ser eficiente na conversão de 10 g/L de glicerol, presente nos subprodutos de produção de biodiesel, em  $\text{H}_2$ . Além disso, verificou-se que a produção de  $\text{H}_2$  representou quase o dobro da produção em  $\text{CO}_2$  ( $\text{H}_2/\text{CO}_2=1,8$ ) o que é bastante vantajoso quando se pretende aplicar um processo de separação/purificação da fase gasosa (Neves, 2009).

Tabela 3.4 - Volumes de  $H_2$  e  $CO_2$ , produzidos a partir da conversão biológica de subprodutos da produção de biodiesel pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação magnética,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Glicerol]_i=10\ g/L$ .

$H_2$ (mL)	$CO_2$ (mL)	$H_2/CO_2$
367,62	207,20	1,80

Tabela 3.5 - Teores de AGV's, etanol e pH da fase líquida a partir da conversão biológica de subprodutos da produção de biodiesel pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação magnética,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Glicerol]_i=10\ g/L$ .

pH	Ácido lático (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido propiónico (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
6,59	0,12	0,19	1,09	2,95	0,37

Observando a Tabela 3.5 verifica-se que a concentração final de glicerol foi de 0,37 g/L, o que sugere que o aumento da concentração inicial do substrato poderá conduzir ao aumento da produção de  $H_2$  e, conseqüentemente, dos rendimentos do processo.

Com base nos valores apresentados nas Tabelas 3.4 e 3.5, calcularam-se os rendimentos do processo em termos de volume de bio $H_2$  produzido por unidade de peso de glicerol consumido e de volume de meio de fermentação (Tabela 3.6).

Observando a Tabela 3.6 pode-se verificar que, neste processo, se produziu 15,14 mmoles  $H_2/g\ glicerol_{cons.}$ , o que é significativamente superior ao obtido por Ito *et al.* (2005), para a mesma concentração inicial de glicerol contido em resíduos de produção de biodiesel (7,71 mmoles  $H_2/g\ glicerol_{cons.}$ ). Estes rendimentos são, por isso, promissores quanto à possibilidade de utilização da estirpe de *E. aerogenes* na fermentação deste tipo de substrato e, conseqüentemente, para aplicação a situações reais.

Tabela 3.6 - Rendimentos de produção de  $H_2$  ( $\eta$ ) a partir da conversão biológica de subprodutos da produção de biodiesel pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação magnética,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Glicerol]_i=10\ g/L$ .

$\eta$		
$[mmoles\ H_2/g\ glicerol_{cons}]$	$[L\ H_2/g\ glicerol_{cons}]$	$[L\ H_2/L_{Fase\ líquida}]$
15,14	0,38	3,64

A capacidade demonstrada pelas bactérias de fermentar o substrato, sem que a presença de outros compostos inviabilize o processo, torna-se uma grande vantagem pois não só possibilita a utilização desses resíduos, sem necessidade de tratamento prévio, como conduz à produção de uma fonte energética *limpa*, como o  $H_2$ , e a uma redução do conteúdo em carga orgânica nos resíduos, por conversão biológica.

### 3.3.1.2 Hidrolisado de pasta de papel

Outro resíduo utilizado como substrato, neste trabalho, foi um hidrolisado obtido a partir de resíduos da produção da pasta de papel (Marques *et al.*, 2007).

Da análise quantitativa e qualitativa dos hidrolisados, por HPLC, este resíduo apresentou a seguinte composição: glucose - 33,8 g/L; xilose - 6,8 g/L e celobiose - 5,5 g/L. Com base nesta caracterização, adicionou-se um volume de hidrolisado correspondente a uma concentração inicial em açúcares no meio de fermentação de aproximadamente 10 g/L.

Na Tabela 3.7 apresenta-se os volumes de  $H_2$ ,  $CO_2$  a partir da conversão biológica de hidrolisado de pasta de papel.

Novamente, as células de *E. aerogenes* mostraram ser eficientes na conversão da fonte de carboidratos contida nos hidrolisados, em  $H_2$ . Contudo, observando a Tabela 3.7 verifica-se que a produção de bio $H_2$  apresentou volumes significativamente inferiores aos obtidos para o glicerol (Tabela 3.5), apesar de o



grau de pureza da fase gasosa (razão volumétrica  $H_2/CO_2=1,4$ ) indicar que a aplicação deste processo pode ser viável.

Tabela 3.7 - Volumes de  $H_2$  e  $CO_2$ , produzidos a partir da conversão biológica de hidrolisado de pasta de papel pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação magnética,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[glucose + xilose + celobiose]_i=10\ g/L$ .

$H_2$ (mL)	$CO_2$ (mL)	$H_2/CO_2$
122,72	90,99	1,40

Também neste ensaio se observou que, após 6 h de incubação, deixou de haver produção de fase gasosa, isto é, foi atingido o equilíbrio do processo. Procedeu-se a recolhas das fases gasosa e líquida para análise da sua composição em gases e em substratos orgânicos, respectivamente.

Na fase líquida obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 3.8, os quais mostram claramente teores em AGV's muito superiores e de etanol inferiores aos registados no ensaio com o glicerol (Tabela 3.5).

Tabela 3.8 - Teores de AGV's, etanol e pH da fase líquida a partir da conversão biológica de hidrolisado de pasta de papel pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação magnética,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[glucose + xilose + celobiose]_i=10\ g/L$ .

pH	Ácido lático (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (g/L)
5,93	1,72	2,35	1,20

No que respeita aos rendimentos obtidos (Tabela 3.9) pode-se afirmar que para a produção de 1 L de  $H_2$ , por fermentação anaeróbia a partir de hidrolisado de pasta de papel, são necessários cerca de 8 gramas de açúcares e de 0,81 litros de fase líquida, ou seja um rendimento três vezes inferior ao caso anterior (Tabela 3.6).

Tabela 3.9 - Rendimentos de produção de  $H_2$  ( $\eta$ ) a partir da conversão biológica de hidrolisado de pasta de papel pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação magnética,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[glucose + xilose + celobiose]_i=10\ g/L$ .

$\eta$		
$[mmoles\ H_2/g\ açúcares_{cons}]$	$[L\ H_2/g\ açúcares_{cons}]$	$[L\ H_2/L_{Fase\ líquida}]$
5,03	0,12	1,22

### 3.3.1.3 Hidrolisado térmico da microalga *S. obliquus*

Por último, testou-se a utilização de microalgas *Scenedesmus obliquus*, como substrato. Embora não tinha sido sujeita a qualquer tipo de pré-tratamento, a biomassa microalgal foi autoclavada com o meio de fermentação, a  $120^\circ C$  e 2 atm, com o objectivo de o passo de esterilização poder funcionar simultaneamente como tratamento físico, para aumentar a fragilidade da parede das microalgas e para se promover a libertação de compostos susceptíveis de serem biodegradados (Miranda, 2011).

Tal como nos estudos anteriores, analisou-se a capacidade da estirpe da bactéria *E. aerogenes* utilizar o hidrolisado térmico das microalgas como substrato orgânico, através da determinação do volume produzido de fase gasosa e do tempo de equilíbrio do processo.

Observou-se a produção de fase gasosa, embora os volumes de  $H_2$  e  $CO_2$  tenham sido significativamente inferiores (Tabela 3.10) aos que foram obtidos para os substratos estudados anteriormente (Tabelas 3.4 e 3.7). Na realidade, esses volumes foram 15 vezes inferiores aos obtidos nos ensaios em que se utilizaram os subprodutos da produção de biodiesel (Tabela 3.4).

Apesar dos baixos teores em  $H_2$  e  $CO_2$ , a razão volumétrica  $H_2/CO_2$  foi de 1,4, o que pode ser considerado como promissor tendo em conta a razão volumétrica  $H_2/CO_2$  dos processos posteriormente ensaiados, O tempo de equilíbrio foi atingido após cerca de 8 h de incubação.

Tabela 3.10 - Volumes de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, produzidos a partir da conversão biológica de biomassa microalgal pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, V<sub>Reactor</sub>/V<sub>Fase líquida</sub>=6, [Bactérias]<sub>i</sub>=0,1 g<sub>Biom. seca</sub>/L<sub>Meio de ferment.</sub>, [Biomassa microalgal]<sub>i</sub>=10 g/L.

H <sub>2</sub> (mL)	CO <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
19,85	14,18	1,40

Da análise da fase líquida verificou-se que, à semelhança do observado para os hidrolisados da pasta de papel, registou-se uma tendência de diminuição da concentração de etanol e um aumento da concentração de AGV's, em comparação com os resultados obtidos para o glicerol (Tabela 3.11).

Tabela 3.11 - Teores em AGV's e etanol e pH da fase líquida, a partir da conversão biológica de biomassa microalgal pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética, V<sub>Reactor</sub>/V<sub>Fase líquida</sub>=6, [Bactérias]<sub>i</sub>=0,1 g<sub>Biom. seca</sub>/L<sub>Meio de ferment.</sub>, [Biomassa microalgal]<sub>i</sub>=10 g/L.

pH	Ácido láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido propiónico (g/L)	Etanol (g/L)
6,63	0,21	1,29	1,60	0,17

Os rendimentos do processo (Tabela 3.12) foram bastante inferiores aos observados para qualquer um dos substratos anteriormente testados (Tabelas 3.6 e 3.9), concluindo-se que seria necessário cerca de 4 L de meio de fermentação e 50,7 g de hidrolisado térmico da microalga para se produzir 1 L de H<sub>2</sub>. Assim sendo, poder-se-á considerar que não só os custos associados à produção de H<sub>2</sub> aumentariam de forma significativa, como um aumento de escala afectaria a logística de matérias-primas, por exemplo numa biorefinaria.

Uma possibilidade de se poder vir a considerar as microalgas como um substrato de interesse, no que respeita a um compromisso dos benefícios/custos envolvidos, seria a sua utilização como resíduo de um processo de extracção de compostos de valor acrescentado, como óleo para produção de biodiesel ou pigmentos, entre outros. A aplicação de um pré-tratamento sobre as microalgas, para obtenção de

uma maior concentração em compostos biodegradáveis, nomeadamente açúcares de cadeia curta, de forma a incrementar os rendimentos do processo, é igualmente uma hipótese a considerar no sentido da redução dos custos de produção de bioH<sub>2</sub> a partir deste tipo de hidrolisado térmico.

Tabela 3.12 - Rendimentos de produção de H<sub>2</sub> ( $\eta$ ) a partir da conversão biológica de biomassa microalgal pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética,  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ ,  $[\text{Bactérias}]_i=0,1 \text{ gBiom. seca/LMeio de ferment.}$ ,  $[\text{Biomassa microalgal}]_i=10 \text{ g/L}$ .

$\eta$		
$[\text{mmoles H}_2/\text{g algas}_{\text{inicial}}]$	$[\text{L H}_2/\text{g algas}_{\text{inicial}}]$	$[\text{L H}_2/\text{L Fase líquida}]$
0,79	0,02	0,20

Verificou-se ainda que o tempo ao fim do qual se atingiu o equilíbrio do processo foi semelhante para os três substratos estudados. Contudo, os volumes de produção da fase gasosa revelaram-se como sendo muito diferentes, destacando-se o glicerol bruto como o substrato com maior volume de bioH<sub>2</sub> produzido (Figura 3.3).

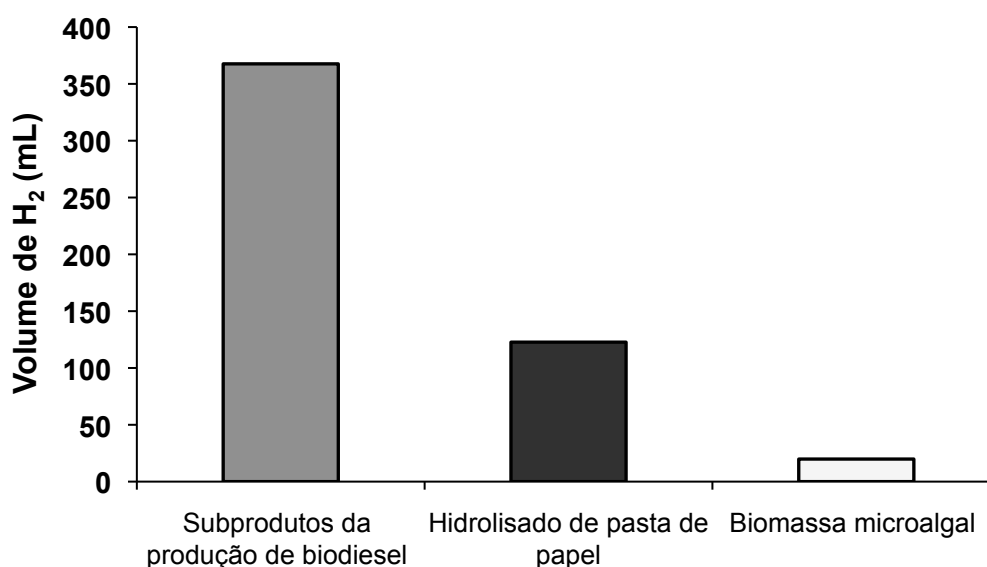


Figura 3.3 - Comparação do volume de H<sub>2</sub> produzido pela estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*), a partir de subprodutos da produção de biodiesel (10 g/L), hidrolisado de pasta de papel (10 g/L) e biomassa microalgal (10 g/L). Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética,  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=1/6$ ,  $[\text{Biomassa}]_i=0,1 \text{ gBiom. seca/LMeio de ferment.}$

### 3.3.2 Determinação da velocidade de produção de bioH<sub>2</sub>

Avaliou-se ainda a cinética do processo de produção de bioH<sub>2</sub> através da determinação das velocidades de produção de bioH<sub>2</sub>, para cada um dos substratos ensaiados.

Assim, para cada um dos substratos orgânicos ensaiados, tendo em consideração o tempo necessário para se atingir o equilíbrio e com o objectivo de não se perturbar os sistemas biológicos ao longo do tempo, o estudo cinético envolveu a preparação de tantos reactores encapsulados quantas as amostras que se pretendia recolher. Os reactores foram então inoculados nas mesmas condições e em simultâneo, a fim de se fazer corresponder cada um deles a uma toma de amostra da fase gasosa e de fase líquida com intervalos de 1h.

A correspondência entre os resultados obtidos para os ensaios que decorreram sob agitação magnética (determinação do tempo de equilíbrio) e os ensaios que decorreram sob agitação orbital (estudos cinéticos), foi possível com base no facto de, em estudos anteriores, se ter demonstrado não haver diferença significativa de valores obtidos para as duas condições operacionais (Neves, 2009).

#### 3.3.2.1 Subprodutos da produção de biodiesel (glicerol em bruto)

Como referido anteriormente, a cada hora retiraram-se amostras do *headspace* e da fase líquida de reactores independentes, para se avaliar os teores em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e AGV's, glicerol e etanol.

A Figura 3.4 apresenta os resultados obtidos para cada reactor, representando a produção de H<sub>2</sub> e a razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, ao longo das 8 horas de processo.

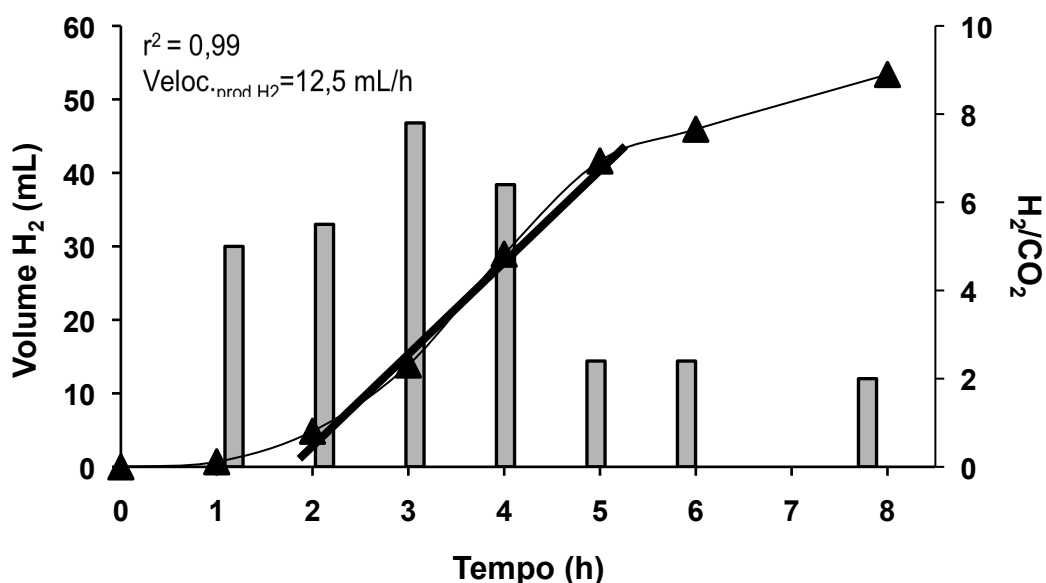


Figura 3.4 - Perfil de produção de H<sub>2</sub> (▲) e da razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (■), ao longo do processo usando, como substrato, subprodutos da produção de biodiesel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\text{ gBiom. seca/LMeio de ferment.}$ ,  $[Glicerol]_i=10\text{g/L}$ .

Observando a Figura 3.4, verifica-se que a maior taxa de produção de H<sub>2</sub> ocorreu no intervalo entre as 2-5 h de processo (12,5 mL/h), o que coincide com a fase exponencial da curva de crescimento da *E. aerogenes* (Figura 3.1). Conclui-se assim que é na fase em que ocorre a maior taxa de crescimento das bactérias que se desenvolve mais eficientemente a via metabólica para a produção de H<sub>2</sub>. Imediatamente antes e após esse período, a velocidade de produção de H<sub>2</sub> é menor e respectivamente de 2,4 mL/h e 3,9 mL/h.

Quanto ao perfil da razão H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, ao longo do tempo, verificou-se que o valor mais elevado ocorreu 3 h após o início do processo, não obstante o facto de o maior volume de H<sub>2</sub> ter-se verificado às 8 h de processo, ao qual corresponde um rendimento específico de 332 mL H<sub>2</sub>/g glicerol<sub>cons.</sub> (Tabela 3.13).

Observando a Tabela 3.13, verifica-se que a partir das 4 h de ensaio e até ao final do processo, os rendimentos apresentaram valores muito próximos (>300 mL H<sub>2</sub>/g glicerol<sub>cons.</sub>), sugerindo que a partir desse tempo foi atingido o potencial máximo de produção de H<sub>2</sub> por fermentação anaeróbia de subprodutos da produção de biodiesel.

Estes resultados apresentam-se bastante promissores na aplicação deste processo a nível industrial, visto que a partir das quatro horas de processo é atingido o potencial máximo de produção de  $H_2$  por grama de glicerol consumido.

Tabela 3.13 - Rendimentos de produção de  $H_2$  ao longo do processo usando, como substrato, subprodutos da produção de biodiesel. Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação orbital=200 rpm,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Glicerol]_i=10\ g/L$ .

Tempo (h)	$\eta$		
	$[mL\ H_2/g\ glicerol_{cons}]$	$[mmoles\ H_2/g\ glicerol_{cons}]$	$[L\ H_2/L_{Fase\ líquida}]$
1	32,53	1,30	0,03
2	86,93	3,48	0,18
3	190,28	7,62	0,52
4	324,75	13,00	1,09
5	308,02	12,33	1,57
6	327,31	13,11	1,73
8	332,23	13,30	2,01

Na Figura 3.5 apresenta-se a variação das concentrações de ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico e etanol, bem como o volume de  $H_2$  e o consumo de glicerol, ao longo do tempo de ensaio de produção de  $bioH_2$  a partir dos subprodutos da produção de biodiesel.

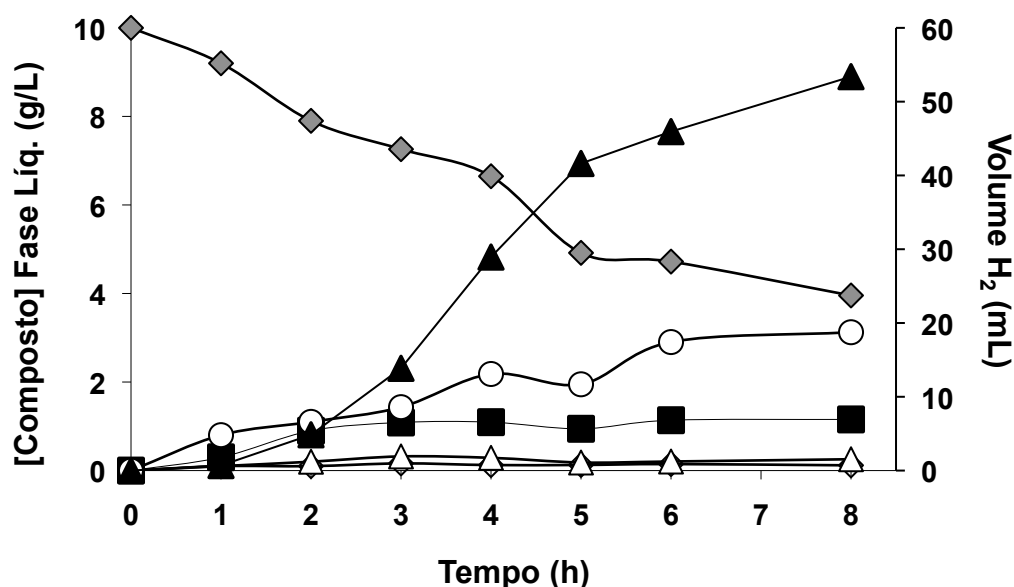


Figura 3.5 - Perfis de produção de ácido láctico (◇), ácido acético (△), ácido propiónico (■), etanol (○), H<sub>2</sub> (▲) e consumo de glicerol (◇), ao longo do processo usando, como substrato, subprodutos da produção de biodiesel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1 \text{ gBiom. seca/LMeio de ferment}$ ,  $[Glicerol]_i=10\text{g/L}$ .

Na Figura 3.5 verifica-se que ao longo do processo a concentração de etanol foi aumentando gradualmente, enquanto que os AGV's mantiveram as suas concentrações sem alterações significativas, à excepção do ácido propiónico que apresentou um aumento da sua concentração nas duas primeiras horas do ensaio, tendo-se mantido depois com uma concentração aproximadamente constante.

A correlação entre a curva do glicerol e do H<sub>2</sub> é bastante evidente, com uma primeira fase de maior consumo a situar-se entre o início do ensaio e as 5 h do processo, e uma segunda fase, das 5 h de ensaio em diante, em que ocorreu uma redução da taxa de consumo de glicerol e, conseqüente, uma redução da produção de bioH<sub>2</sub>.

### 3.3.2.2 Hidrolisado da pasta de papel

Com o objectivo de se determinar a velocidade de produção de bioH<sub>2</sub> e o tempo de equilíbrio do processo com o hidrolisado da pasta de papel, realizou-se um ensaio semelhante ao que foi desenvolvido para os subprodutos da produção de biodiesel.



A Figura 3.6 apresenta o volume de produção de bioH<sub>2</sub> e a razão H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, ao longo do processo de fermentação do hidrolisado da pasta de papel.

Observando a Figura 3.6 e comparando os resultados apresentados com os obtidos para o glicerol em bruto (Figura 3.4) verifica-se que, no intervalo de tempo de ensaio compreendido entre 1 h e 3 h, os perfis de produção de H<sub>2</sub> seguiram uma tendência muito semelhante à que foi registada para os subprodutos da produção de biodiesel, com velocidades de produção de H<sub>2</sub> de 5,3 e 6,5 mL/h, respectivamente. Contudo, a taxa máxima de produção de H<sub>2</sub> foi inferior (7,3 mL/h) à calculada para os subprodutos da produção de biodiesel (12,5 mL/h).

Quanto à razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, tal como para o glicerol bruto, esta apresentou um valor máximo às 3 horas de ensaio, com o valor de 6,5, o que sugere que, para qualquer um destes substratos, a bactéria desenvolveu uma via metabólica com maior tendência para a produção de H<sub>2</sub> do que para a produção de CO<sub>2</sub>. No entanto, para o hidrolisado da pasta de papel esse pico é seguido de um decréscimo significativo para uma razão H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> de 1,4.

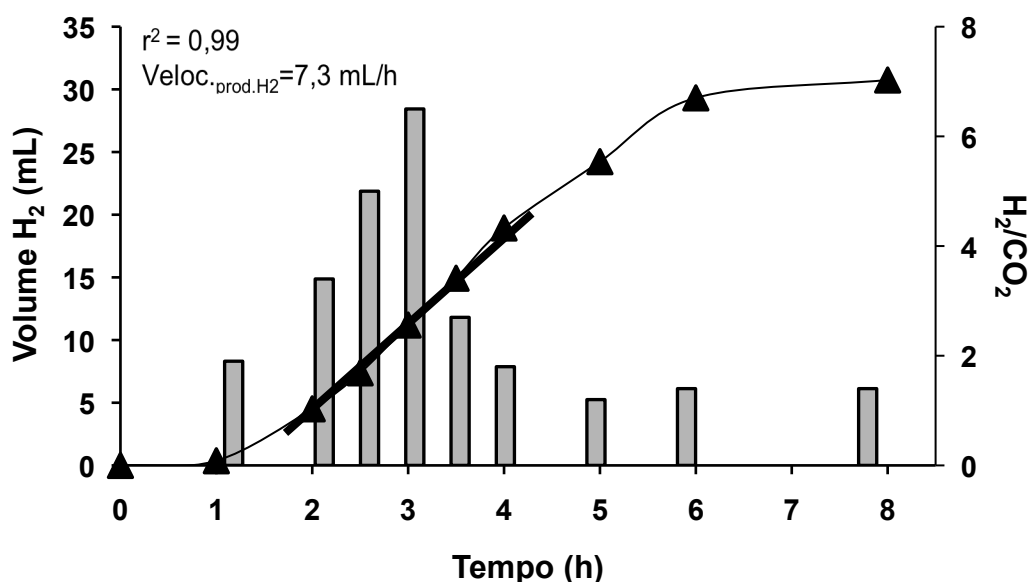


Figura 3.6 - Perfil de produção de H<sub>2</sub> (▲) e da razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (■) ao longo do processo usando, como substrato hidrolisado de pasta de papel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{Reactor}/V_{Fase \text{ líquida}}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1 \text{ g}_{Biom. \text{ seca}}/L_{Meio \text{ de ferment.}}$ ,  $[glucose + xilose + celobiose]_i=10\text{g/L}$ .

Relativamente aos rendimentos de produção (Tabela 3.14) constata-se que a fermentação anaeróbia dos açúcares contidos no hidrolisado de pasta de papel conduziram a rendimentos com valores 50% inferiores aos registados para o glicerol em bruto, o que sugere que esta fonte de carbono apresenta um menor potencial de utilização, como substrato orgânico, nas condições operacionais e ambientais utilizadas.

Tabela 3.14 - Rendimentos de produção de  $H_2$  ao longo do processo usando, como substrato, hidrolisado de pasta de papel. Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação orbital=200 rpm,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom. seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[glucose + xilose + celobiose]_i=10\ g/L$ .

Tempo (h)	$\eta$		
	$[mL\ H_2/g\ açúcares_{cons}]$	$[mmoles\ H_2/g\ açúcares_{cons}]$	$[L\ H_2/L\ Fase\ líquida]$
1	1,74	0,07	0,01
2	19,98	0,80	0,17
2,5	31,57	1,26	0,28
3	46,81	1,87	0,42
3,5	62,42	2,50	0,56
4	79,17	3,17	0,71
5	101,28	4,06	0,91
6	121,78	4,88	1,10
8	127,70	5,11	1,16

A Figura 3.7 apresenta o perfil de produção de ácidos gordos voláteis, etanol e  $H_2$  e de consumo de açúcares, ao longo do processo de fermentação anaeróbia do substrato, hidrolisado de pasta de papel.

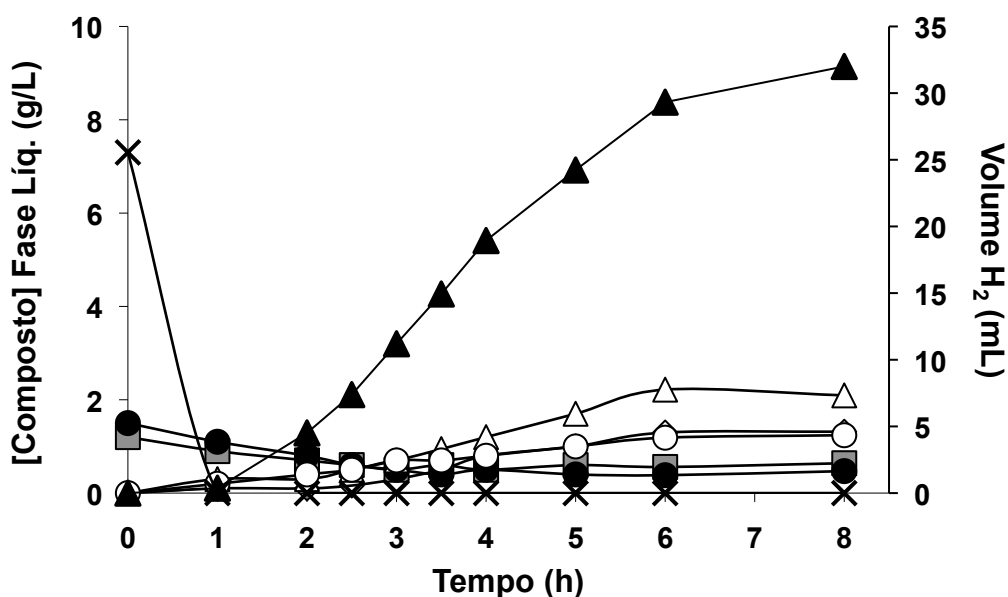


Figura 3.7 - Perfis de produção de ácido lático (◇), ácido acético (△), etanol (○), H<sub>2</sub> (▲) e consumo de glucose (×), xilose (●), e celobiose (■), ao longo do processo usando, como substrato, Hidrolisado de pasta de papel. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1 \text{ g}_{\text{Biom. seca}}/\text{L}_{\text{Meio de ferment.}}$ ,  $[glucose + xilose + celobiose]_i=10 \text{ g/L}$ .

O perfil de produção de AGV's (Figura 3.7) apresenta algumas diferenças em relação ao ensaio com os subprodutos da produção de biodiesel (Figura 3.5), em que o ácido acético exibe um aumento gradual da concentração, situando-se ligeiramente acima do etanol.

Os açúcares foram consumidos rapidamente, em especial a glucose, pelo que a concentração total de açúcares, no final do processo, foi muito reduzida.

### 3.3.2.3 Hidrolisado térmico da microalga *S. obliquus*

Por último, avaliou-se a velocidade de produção de H<sub>2</sub> usando, como substrato, o hidrolisado térmico da microalga *S. obliquus*, obtido por autoclavagem.

A Figura 3.8 apresenta o perfil de produção de H<sub>2</sub>, ao longo do processo, assim como a razão H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Observando a Figura 3.8 verifica-se mais uma vez que a curva de produção H<sub>2</sub> acompanhou a curva de crescimento da bactéria. Todavia, o resultado cumulativo da produção foi apenas de 4,7 mL H<sub>2</sub>, o que corresponde, para o mesmo período de tempo, a um valor 6,5 e 11,4 vezes inferior aos que foram

registados para o hidrolisado da pasta de papel e glicerol bruto, respectivamente. Um outro aspecto a salientar é o de que o perfil da razão  $H_2/CO_2$  apresentou uma tendência de crescimento com o tempo de ensaio, tendo atingindo o valor máximo de 1,5 após 6 h de ensaio, o que diverge da tendência que se verificou nos ensaios anteriores, em que a razão máxima de  $H_2/CO_2$  se registou na 3ª hora do ensaio de fermentação.

A velocidade de produção de  $H_2$ , neste ensaio, foi a mais baixa de entre as registadas para todos os substratos estudados no presente trabalho (1,22 mL/h).

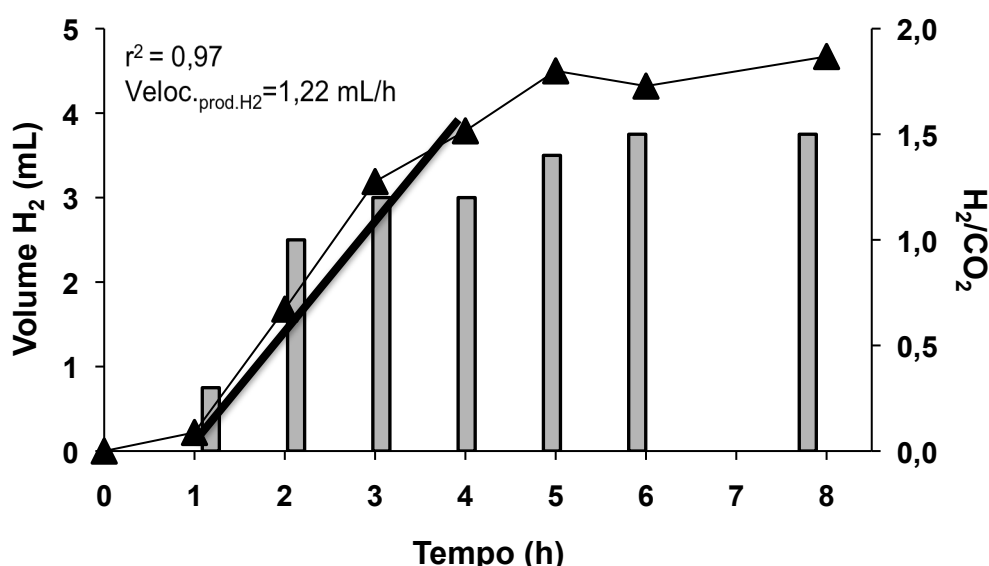


Figura 3.8 - Perfis de produção de  $H_2$  (▲) e razão volumétrica  $H_2/CO_2$  (■) ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgal. Condições experimentais:  $T=30^\circ\text{C}$ , agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1 \text{ g}_{Biom.\text{ seca}}/L_{Meio\ de\ ferment}$ ,  $[Biomassa\ microalgal]_i=10\text{g/L}$ .

Quanto aos valores dos rendimentos de produção calculados (Tabela 3.15), ao longo do tempo de ensaio, verifica-se claramente que só a partir das 3 h de ensaio se registou um aumento gradual e pouco significativo da ordem de 5 mL  $H_2$ /g biomassa microalgal.

Outro aspecto a salientar é o facto de este substrato registar um rendimento máximo de apenas 0,18 L  $H_2$ /L<sub>Fase líquida</sub> (Tabela 3.15), isto é, serão necessários 5,5 litros de meio de fermentação e 56,8 g de biomassa microalgal para se produzir 1 litro de  $H_2$ , o que poderá inviabilizar a produção de bio $H_2$  a uma escala industrial, visto ser

necessário elevadas quantidades de biomassa microalgal para a produção de quantidades significativas de  $H_2$ , com excessivos custos associados.

Tabela 3.15 - Rendimentos de produção de  $H_2$  ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgal. Condições experimentais:  $T=30^\circ C$ , agitação orbital=200 rpm,  $V_{Reactor}/V_{Fase\ líquida}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1\ g_{Biom.\ seca}/L_{Meio\ de\ ferment.}$ ,  $[Biomassa\ microalgal]_i=10\ g/L$ .

$\eta$			
Tempo (h)	$[mL\ H_2/g\ algas]_{inicial}$	$[mmoles\ H_2/g\ algas]_{inicial}$	$[L\ H_2/L_{Fase\ líquida}]$
1	0,26	0,01	0,00
2	7,05	0,28	0,07
3	12,61	0,50	0,13
4	13,86	0,56	0,14
5	15,70	0,63	0,16
6	16,26	0,65	0,16
8	17,15	0,70	0,18

Os resultados apresentados acima para a utilização da biomassa microalgal, como substrato, nos parâmetros operacionais e ambientais aplicados evidenciam a necessidade de otimização das condições de pré-tratamento da biomassa e condições de operação do processo fermentativo.

Na Figura 3.9 apresenta-se o perfil de produção de ácidos gordos voláteis, etanol e  $H_2$  ao longo do processo de fermentação anaeróbia do substrato, biomassa microalgal.

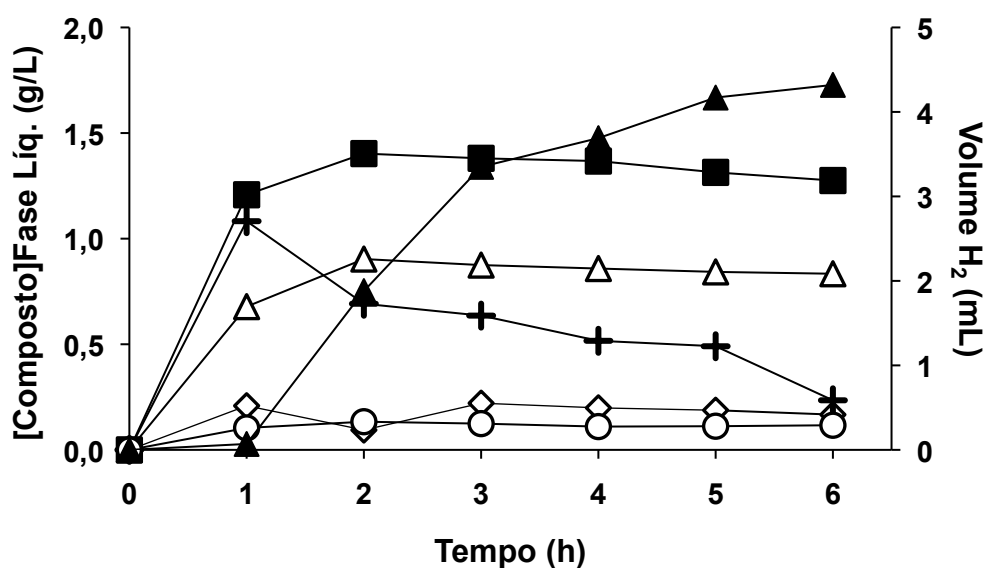


Figura 3.9 - Perfis de produção de ácido láctico (◇), ácido fórmico (+), ácido acético (△), ácido propiónico (■), etanol (○) e H<sub>2</sub> (▲), ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgal. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{\text{Reator}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ ,  $[\text{Biomassa}]_i=0,1 \text{ g}_{\text{Biom. seca}}/\text{L}_{\text{Meio de ferment.}}$ ,  $[\text{Biomassa microalgal}]_i=10\text{g/L}$ .

Na Figura 3.9 verifica-se claramente que o perfil de produção do Ácido fórmico apresenta uma concentração de 1 g/L, ao fim da 1ª hora de fermentação, o que sugere que este composto poderá fazer parte da composição do substrato da biomassa microalgal, visto que durante o processo a concentração de ácido fórmico diminuiu por via do consumo da bactéria para a produção de H<sub>2</sub>.

A Figura 3.10 apresenta os perfis de produção de H<sub>2</sub>, obtidos para cada um dos substratos em estudo, para comparação e avaliação da sua aplicabilidade num processo de produção de bioH<sub>2</sub>, por fermentação anaeróbia. A Figura 3.10 mostra claramente que os subprodutos da produção de biodiesel apresentaram o volume mais elevado de produção de H<sub>2</sub>, aliado ao facto de o substrato ter sido todo consumido, o que sugere a necessidade de estudos posteriores em que se proceda ao aumento da concentração inicial do substrato orgânico. Por outro lado, a utilização de biomassa microalgal conduziu aos piores resultados de produção de H<sub>2</sub>, evidenciando a necessidade de optimização dos pré-tratamento da biomassa microalgal e das condições de operação do processo fermentativo, por forma a melhorar a sua *performance*.

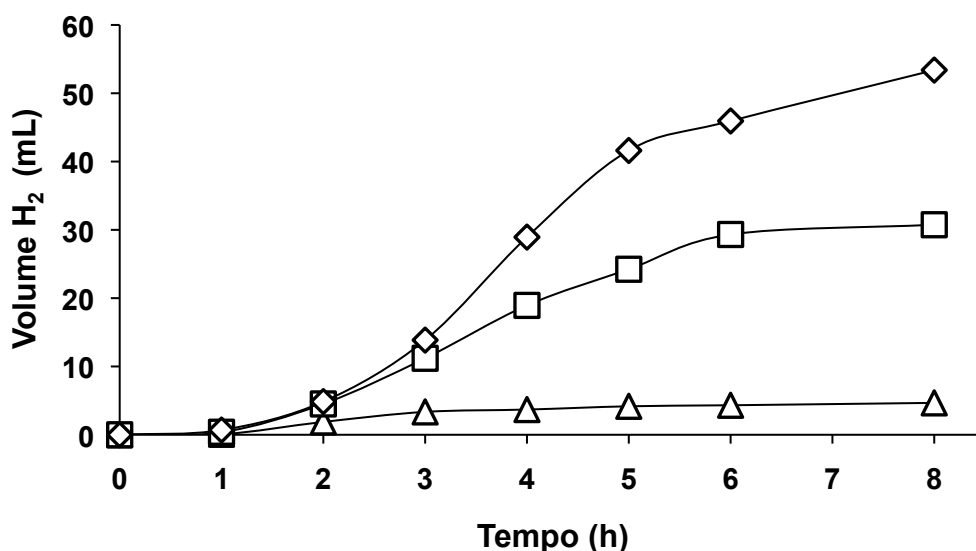


Figura 3.10 - Comparação da velocidade de produção de bioH<sub>2</sub> em função dos diferentes tipos de substratos usados ao longo do processo, como os subprodutos de produção de biodiesel (◇), o hidrolisado de pasta de papel (□) e a biomassa microalgal (△). Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm,  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1 \text{ g}_{\text{Biom. seca}}/\text{L}_{\text{Meio de ferment.}}$

### 3.4 Alteração das condições operacionais para optimização do processo

Foram realizados ensaios em que se procedeu à alteração de alguns parâmetros/procedimentos para estudar o seu efeito sobre o processo de produção de bioH<sub>2</sub>, nomeadamente o tempo de autoclavagem do meio contendo biomassa microalgal, a presença de microalgas no pré-inóculo e a moagem da biomassa microalgal previamente à sua utilização.

### 3.4.1 Efeito do tempo de autoclavagem do meio contendo biomassa microalgal

Miranda *et al.* (2012) mostraram que as condições de temperatura e pressão, levadas a cabo quando se autoclavaram algas *Senedesmus obliquus* em meio líquido, resultaram num pré-tratamento físico resultando a sua aplicação na solubilização/extracção de compostos das microalgas para a fase líquida (Miranda *et al.*, 2012). Com base nesta observação e com o objectivo de otimizar a produção de bioH<sub>2</sub> a partir da biomassa microalgal, realizaram-se ensaios em que se sujeitou o meio de fermentação, contendo as microalgas, a 30 min de autoclavagem, para comparação com os resultados obtidos para um tempo de autoclavagem de 15 min (tempo de autoclavagem utilizado em todos os ensaios descritos anteriormente). As restantes condições da inoculação foram as que se encontram descritas na secção 2.2.2.

A Tabela 3.16 apresenta os resultados para as duas condições operacionais, em termos dos rendimentos do processo e grau de pureza da fase gasosa (razão H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). O aumento do tempo de exposição às condições de autoclavagem (T=121°C; P=2 bar; T=30 min) não conduziu a uma melhoria da produção de H<sub>2</sub>, mas sim a uma diminuição do rendimento do processo em cerca de 20%. Este resultado sugere que o aumento do tempo de autoclavagem poderá ter dado origem a libertação/formação de compostos tóxicos ou à polimerização de alguns dos compostos libertados, dificultando o processo de conversão biológica.

Tabela 3.16 - Efeito do tempo de autoclavagem do meio contendo 10g/L de microalgas sobre os rendimentos de produção de H<sub>2</sub> e razões H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Condições experimentais: T=30°C, agitação magnética,  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ ,  $[Bactérias]_i=0,1 \text{ gBiom. seca/LMeio de ferment.}$ ,  $[Biomassa microalgal]_i=10 \text{ g/L}$ .

Tempo de autoclavagem	$\eta$ [mL H <sub>2</sub> /gBiomassa microalgal]	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>
15	22,00	1,40
30	17,60	1,30



### 3.4.2 Efeito da presença de microalgas no pré-inóculo

Numa tentativa de adaptação das bactérias à presença das microalgas, com vista ao possível aumento do rendimento do processo, levaram-se a cabo testes em que o crescimento das bactérias, para inoculação do meio de fermentação, ocorreu na presença de 1 g/L de biomassa microalgal de *S. obliquus* não activa.

Para preparação do pré-inóculo, o meio de crescimento (água de peptona) foi autoclavado contendo já as microalgas, durante 15 e 30 min.

De modo a abranger todas as possibilidades de cruzamento de condições, o meio de fermentação contendo a biomassa microalgal foi igualmente sujeito a diferentes tempos de autoclavagem, mesmo considerando os resultados obtidos na secção 3.5.1. Os procedimentos e condições para a realização destes ensaios encontram-se descritos no capítulo *Materiais e Métodos*, na secção 2.2.3.

A Figura 3.11 mostra os valores dos rendimentos do processo e da razão  $H_2/CO_2$ , obtidos para as diferentes combinações de parâmetros. A Figura 3.11 mostra claramente que, em geral, a presença de microalgas na preparação do pré-inóculo conduziu a um ligeiro aumento dos rendimentos do processo, com excepção dos ensaios em que o tempo de autoclavagem do meio de crescimento, contendo 1 g/L de microalgas, e do meio de fermentação, contendo 10 g/L de microalgas, foi de 15 min. Este resultado confirma que o aumento do tempo de autoclavagem pode resultar num aumento da libertação de compostos tóxicos que poderão, de certa forma, inibir o processo de produção de  $bioH_2$  pela a bactéria, à semelhança do que foi indicado na secção 3.5.1.

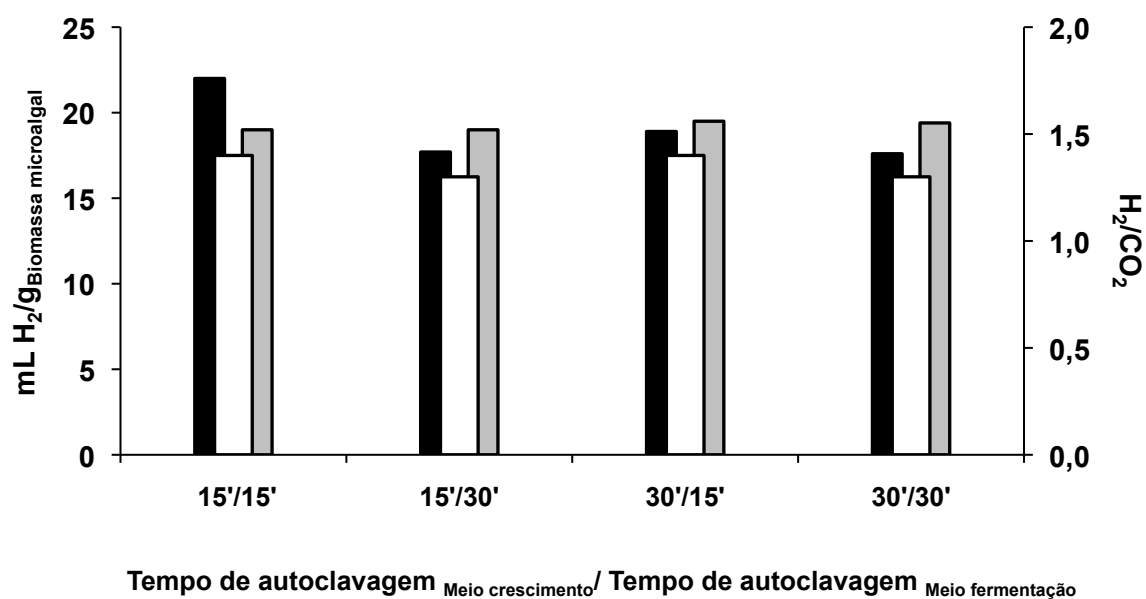


Figura 3.11 - Rendimentos de produção de  $\text{H}_2$  na presença (▤) e na ausência (■) de microalgas no pré-inoculo, e razões  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (▥) para diferentes tempos de autoclavagem. Condições experimentais: Tempo de autoclavagem do meio de crescimento contendo 1 g/L de microalgas=15 e 30min; Tempo de autoclavagem do meio de fermentação contendo 10 g/L de microalgas=15 e 30min;  $T=30^\circ\text{C}$ , agitação magnética,  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ ,  $[\text{Bactérias}]_i=0,1 \text{ g}_{\text{Biom. seca}}/\text{L}_{\text{Meio de ferment.}}$ ,  $[\text{Biomassa microalgal}]_i=10 \text{ g/L}$ .

### 3.4.3 Estudo do efeito da moagem das microalgas

Nesta fase do trabalho pretendeu-se verificar se a moagem da biomassa microalgal, antes da sua utilização, poderia melhorar a metabolização pela bactéria *E. aerogenes*, com a consequente optimização do processo de produção de bioH<sub>2</sub>. Para tal, realizaram-se ensaios em que a preparação do meio de fermentação foi levado a cabo segundo o procedimento de autoclavagem dos reactores encapsulados, durante 15 minutos, mas na presença de 10 g/L de microalgas após moagem. A moagem das microalgas realizou-se por meio da acção mecânica de um moinho de esferas durante 3 minutos e meio.

A Figura 3.12 compara os perfis de produção de H<sub>2</sub> e da razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ao longo do processo, num meio onde a biomassa microalgal foi submetida a moagem prévia com um meio onde esse pré-tratamento não foi aplicado. A velocidade de produção de H<sub>2</sub> foi superior (2,32 mL/h) no meio em que o pré-tratamento de moagem não foi aplicado, para o período de ensaio compreendido entre 1 h e 3 h de fermentação. Este resultado sugere que moagem das microalgas, como pré-tratamento, não só não facilitou a metabolização do substrato, pelas bactérias, como pode ter originado a libertação de compostos tóxicos para o meio de fermentação, resultando num decréscimo da produção de H<sub>2</sub>.

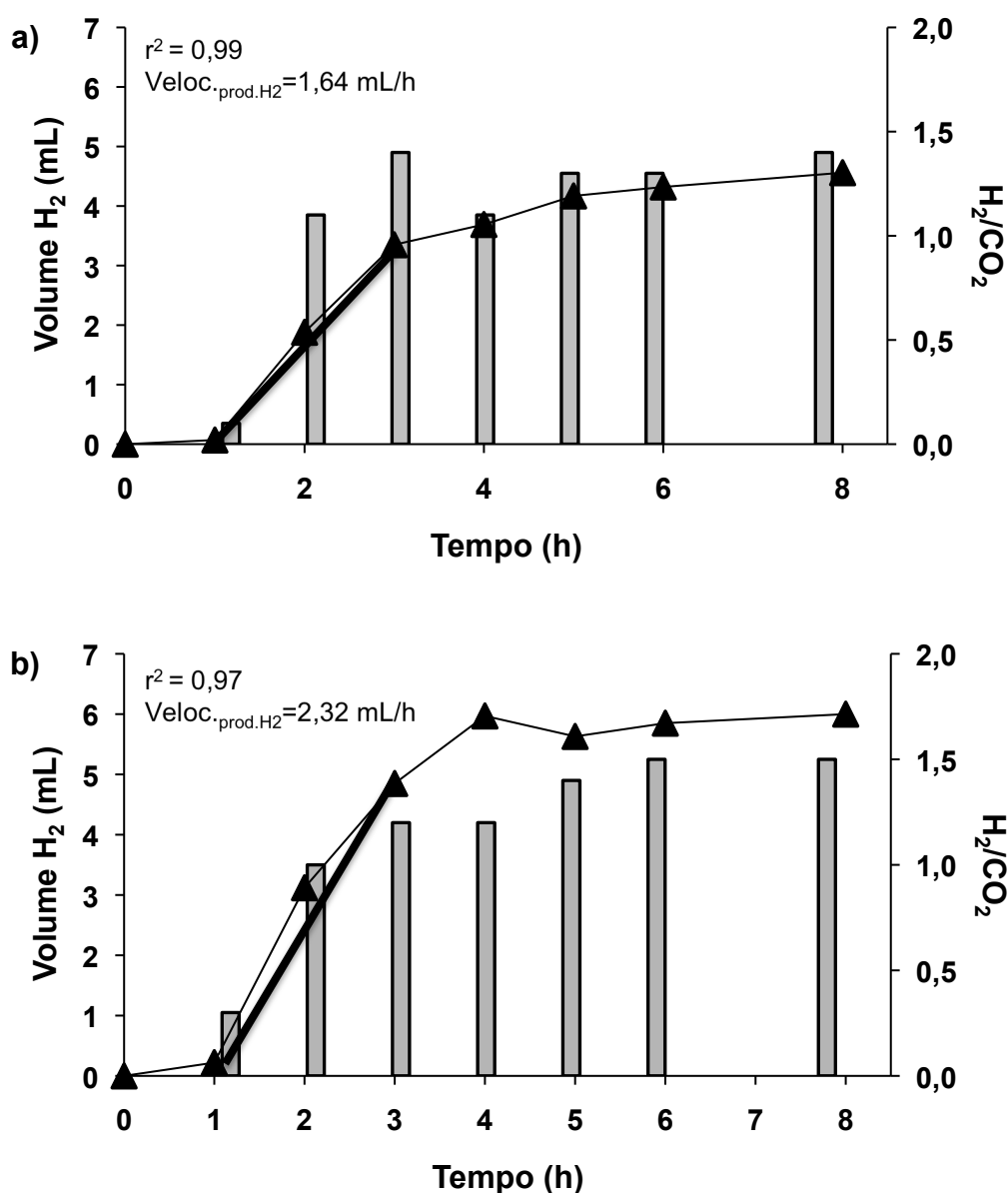


Figura 3.12 - Perfis de produção de H<sub>2</sub> (▲) e razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (■) ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgal com moagem (a) e sem moagem (b). Determinação da velocidade de produção de H<sub>2</sub>. Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ ,  $[\text{Biomassa}]_i=0,1 \text{ g Biom. seca/L Meio de ferment.}$ ,  $[\text{Biomassa microalgal}]_i=10\text{g/L}$ .

No que respeita à análise da fase líquida ao longo do processo fermentativo, os perfis dos valores apresentados na Figura 3.13 mostram que a produção de AGV's e etanol foram muito semelhantes, o que indica que, em ambos os casos, a bactéria não apresentou alteração da produção de compostos, exceptuando a produção de H<sub>2</sub> que no caso do ensaio com microalgas sem moagem o volume foi significativamente superior.

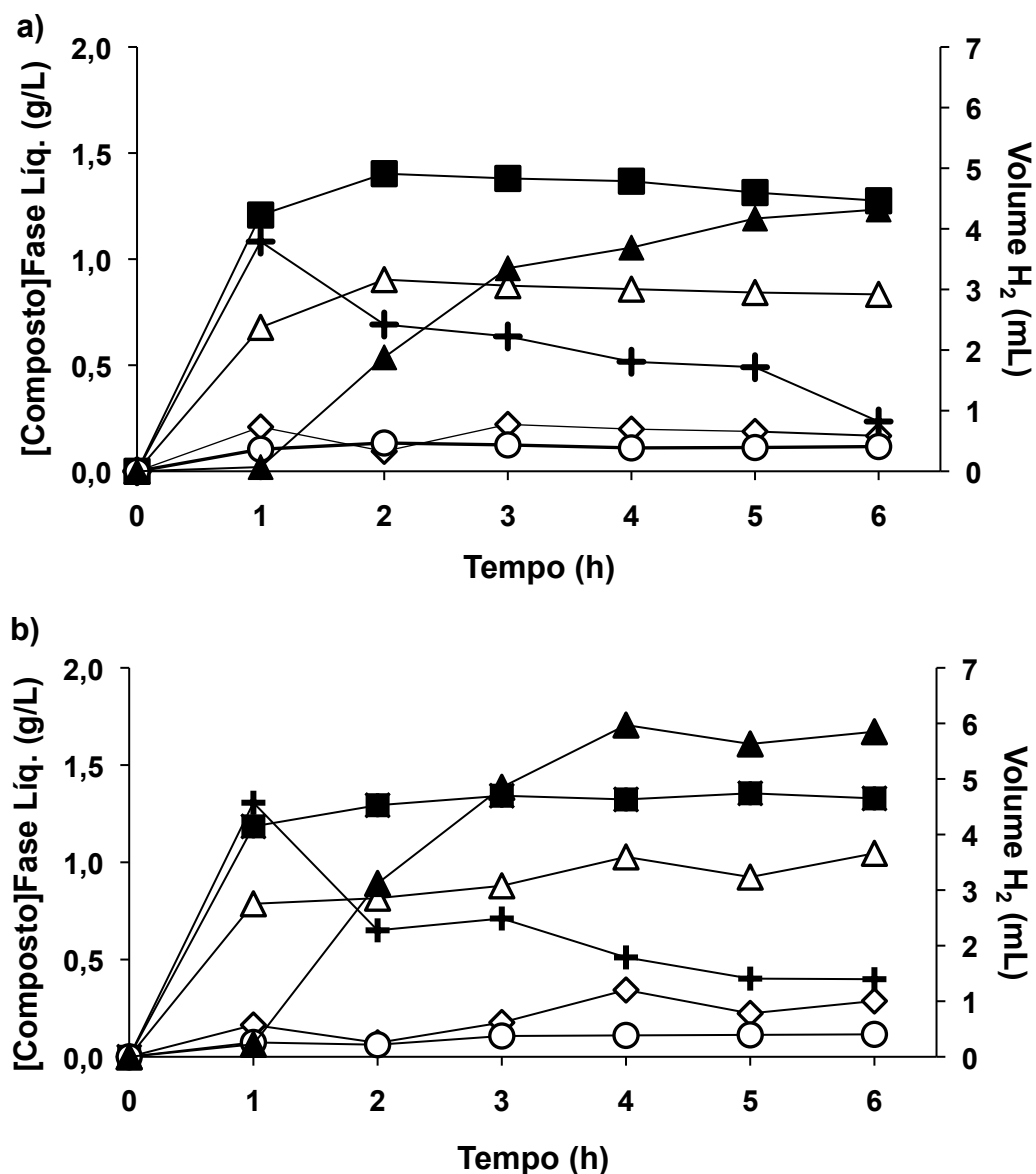


Figura 3.13 - Perfis de produção de ácido láctico (◇), ácido fórmico (+), ácido acético (△), ácido propiônico (■), etanol (○) e H<sub>2</sub> (▲), ao longo do processo usando, como substrato, biomassa microalgas com moagem (a) e sem moagem (b). Condições experimentais: T=30°C, agitação orbital=200 rpm, Razão  $V_{\text{Reactor}}/V_{\text{Fase líquida}}=6$ ,  $[Biomassa]_i=0,1 \text{ g}_{\text{Biom. seca}}/\text{L}_{\text{Meio de ferment.}}$ ,  $[Biomassa \text{ microalgal}]_i=10\text{g/L}$ .



## **Capítulo 4: Conclusões Gerais e Sugestões para Trabalho Futuro**





O objectivo deste trabalho foi avaliar a utilização de diferentes fontes de carbono complexas, como substrato orgânico, num processo fermentativo de produção de  $H_2$ , por uma estirpe da bactéria *E. aerogenes*. Utilizaram-se resíduos da produção de biodiesel contendo glicerol (86% m/m), hidrolisado obtido a partir de resíduos da produção da pasta de papel contendo glucose, xilose e celobiose e biomassa microalgal (*Scenedesmus obliquus*).

De uma forma global, a estirpe da bactéria *E. aerogenes*, utilizada neste trabalho, mostrou ser eficiente na conversão dos substratos complexos estudados. Esta capacidade de fermentar o substrato, sem que a presença de outros compostos inviabilize o processo, torna-se uma grande vantagem, pois não só possibilita a utilização desses subprodutos/resíduos, sem necessidade de tratamentos prévios, como conduz à produção de uma fonte energética *limpa*, como o hidrogénio, e a um abaixamento da sua carga orgânica, por conversão biológica, em condições de temperaturas próximas da ambiente e pressão atmosférica.

Numa fase inicial do trabalho, estudou-se o efeito de parâmetros com influência no processo, como metodologia de inoculação do meio de fermentação, concentração do inóculo e metodologia de recolha de fase gasosa, tendo-se estabelecido que a adição directa de um volume de pré-inóculo, correspondente a 10% (v/v) do volume da fase líquida, e a despressurização prévia dos reactores encapsulados, antes da toma da amostra da fase gasosa, no centro da *headspace*, corresponderiam às condições e procedimentos óptimos a adoptar para todos os ensaios.

No que respeita à produção de  $H_2$ , constatou-se que, em geral, um tempo de 8 horas foi suficiente para se atingir o equilíbrio do processo, para os diferentes substratos estudados. Os subprodutos da produção de biodiesel conduziram aos valores mais elevados de rendimento volumétrico do processo, com 332 mL  $H_2$ /g glicerol<sub>cons</sub>, seguido dos hidrolisados da pasta de papel (127 mL  $H_2$ /g açúcares<sub>cons</sub>). O menor rendimento volumétrico de produção de hidrogénio registou-se para a biomassa microalgal (17,2 mL  $H_2$ /g alga<sub>inicial</sub>).

A partir da determinação da velocidade de produção de bio $H_2$ , para cada substrato orgânico, constatou-se que, na fase exponencial de crescimento, os subprodutos da produção de biodiesel conduziram a uma velocidade de produção de  $H_2$  de 12,5

mL/h, seguido-se os hidrolisados de pasta de papel, com 7,3 mL/h, e, por último, a biomassa microalgal, com 1,22 mL/h.

Durante o estudo da cinética do processo procedeu-se à recolha da fase líquida de cada ensaio, de modo a determinar-se o perfil de produção de ácidos gordos voláteis (AGV's) e etanol para cada um dos substratos. Constatou-se que os subprodutos de produção de biodiesel apresentaram um aumento gradual da concentração de etanol, enquanto que a concentração de AGV's manteve o perfil ao longo do processo. No caso do hidrolisado de pasta de papel constatou-se que o processo de fermentação anaeróbia pela bactéria privilegiou a produção de AGV's, com especial ênfase do ácido acético, com uma concentração final de 2,1 g/L. Por último, constatou-se que a fermentação anaeróbia do substrato de biomassa microalgal resultou no consumo de ácido fórmico pela bactéria, para a produção de  $\text{bioH}_2$ .

Numa tentativa de optimização de resultados, para a biomassa microalgal, variaram-se alguns parâmetros relativos ao seu pré-tratamento. Verificou-se que o aumento do tempo de autoclavagem, de 15 para 30 minutos, do meio de fermentação contendo a biomassa microalgal, conduziu a um decréscimo do rendimento do processo em cerca de 20%, sugerindo que o aumento do tempo de autoclavagem favorece a libertação de compostos tóxicos para o meio, dificultando assim a conversão biológica. Já a inoculação do meio de fermentação a partir de um pré-inóculo produzido na presença de 1 g/L de microalgas, conduziu a valores de rendimento de produção de  $\text{H}_2$  ligeiramente superiores, mesmo para tempos de autoclavagem superiores, o que sugere alguma adaptação das bactérias com consequente melhor desempenho no processo. A moagem da biomassa microalgal, antes da sua adição ao meio de fermentação e autoclavagem, conduziu também à diminuição da produção de  $\text{bioH}_2$ .

O processo desenvolvido neste trabalho mostrou ser eficiente quanto aos objectivos propostos, principalmente no que respeita à utilização do glicerol em bruto, como substrato. Os resultados obtidos foram promissores, com vista à aplicação deste

sistema a situações reais, tornando interessante a realização de estudos posteriores. Assim as sugestões propostas para trabalho futuro são:

- ⇒ A realização de um estudo de avaliação económica com vista ao aumento de escala do processo de produção de  $\text{bioH}_2$  por *dark-fermentation*;
- ⇒ O estudo de optimização do *design* do reactor para uma melhor produção/separação de gases;
- ⇒ O aproveitamento do meio de fermentação resultante do processo, contendo AGV's, para a produção de hidrogénio ou de hidrocarbonetos por um processo de electrólise ou por hidrogenação de óleos usados, respectivamente;
- ⇒ O estudo de possível aplicação deste processo em regime contínuo;
- ⇒ A avaliação da utilização de outros resíduos agro-industriais como substratos para a produção de  $\text{bioH}_2$ ;



## **Capítulo 5: Bibliografia**



BP (2011) Statistical Review of World Energy. *British Petroleum*, 49 pp.

Brennan, L., Owende, P. (2010) "Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.

Das, D. (2009) "Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization." *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 734-7357.

Das, D., Veziroglu, T. (2008) "Advances in biological hydrogen production processes." *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6046-6057.

Demirbas, M. (2009) "Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review." *Applied Energy*, 86, 151-161.

Ding, J., Wang, X., Zhou, X., Ren, N., Guo, W. (2010) "CFD optimization of continuous stirred-tank (CSTR) reactor for biohydrogen production." *Bioresource Technology*, 101, 7005-7013.

Directiva Europeia 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril de 2009 (DL nº 117/2010), relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as Directivas 2001/77 e 2003/30/CE.

Drapcho, C.M., Nhuan, N.P., Walker, T.H. (2008) "Biofuel Engineering Process Technology." *Mc Graw Hill*, 385 pp.

Gonzalez, R., Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. (2008) "A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*." *Metabolic Engineering*, 10, 234-245.

Guo, Y., Fan, S., Fan, Y., Pan, C., Hou, H. (2010) "The preparation and application of crude cellulase for cellulose-hydrogen production by anaerobic fermentation." *International Journal Of Hydrogen Energy*, 35, 459-468.

IEA (2010) World Energy Outlook. *International Energy Agency*, 738 pp.

IPCC (2007) Climate Change Synthesis Report, Fourth Assessment. *Intergovernmental Panel on Climate Change*, 52 pp.

Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., Nishio, N. (2005) "Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 260-265.

Kapdan, I., Karapinar, Kargi, F. (2006) "Bio-hydrogen production from waste materials." *Enzyme and Microbial Technology*, 569-582.

Lakshmidevi, R., Muthukumar, K. (2010) "Enzymatic saccharification and fermentation of paper and pulp industry effluent for biohydrogen production." *International Journal Of Hydrogen Energy*, 35, 3389-3400.

Lederberg, J., Martin, A. (2000) Encyclopedia of Microbiology. 2nd ed. San Diego, Ca. *Academic Press*, 3944 pp.

Marques, A.E., Barbosa, A.T., Jotta, J., Coelho, M.C., Tamagnini, P., Gouveia, L. (2011) "Biohydrogen production by *Anabaena* sp. PCC 7120 wild-type and mutants under different conditions: Light, nickel, propane, carbon dioxide and nitrogen." *Biomass and Bioenergy*, 35, Issue 10, 4426-4434.

Marques, P.A.S.S., Bartolomeu, M.L., Tomé, M.M., Neves, L.M. (2009) "Biohydrogen production from glycerol by a strain of *Enterobacter aerogenes*." *Artigo publicado no livro de proceedings do Congresso HYPOTHESIS VIII* (comunicação oral).



Marques, S., Alves, L., Roseiro, J., Gírio, F. (2007) "Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*." *Biomass and Energy*, 32, 400-406.

Miranda, J.R., Passarinho, P.C., Gouveia, L. (2012) "Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production." *Bioresource Technology*, 104, 342-348.

Miranda, J.R. (2011) "Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus*." *Tese para a obtenção do grau de Mestre de Energia e Bioenergia, UNL-FCT*, Lisboa, 102 pp.

Neves, P. (2009) "Produção de biohidrogénio por bactérias a partir de resíduos fermentáveis." *Tese para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica, UNL-FCT*, Lisboa, 108 pp.

Quido, S., Smejkalová, L., Kubicka, D. (2009) "Thermodynamic balance in reaction system of total vegetable oil hydrogenation." *Chemical Engineering Journal*, 146, 155-160.

Ricardo, C. (2009) "Produção de biohidrogénio por fermentação anaeróbia a partir de resíduos fermentescíveis." *Tese para a obtenção do grau de Mestre em Energia e Ambiente, UL-FC*, Lisboa, 56 pp.

Sergei, A., Markov, Averitt, J., Waldron, B. (2011) "Bioreactor for glycerol conversion into H<sub>2</sub> by bacterium *Enterobacter aerogenes*." *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 262-266.

Singh, S., Sudhakaran, A., Sarma, P., Subudhi, S., Mandal, A., Lal, G. (2010) "Dark fermentative biohydrogen production by mesophilic bacterial consortia isolated from riverbed sediments." *International Journal Of Hydrogen Energy*, 35, 10645-10652.

Sinha, P., Pandley, A. (2011) "An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7460-7478.

Tanisho, S., Kuromoto, M., Kadokura, N. (1998) "Effect of CO<sub>2</sub> removal on hydrogen production by fermentation." *International Journal of Hydrogen Energy*, 559-563.

Thomas, G. (2000) "Overview of Storage Development DOE Hydrogen Program." *Sandia National Laboratories*, 14 pp.

Wang, J., Wan, W. (2009) "Factors influencing fermentative hydrogen production: A review." *International Journal Of Hydrogen Energy*, 34, 799-811.

Won, S., Lau, A. (2011) "Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor." *Bioresource Technology*, 102, 6876-6883.

Yu, J., Takahashi, P. (2007) "Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae." *Hawaii Natural Energy Institute, University of Hawaii*, 11pp.

Zhang, C., Xiang, F., Xing, X. (2011) "Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production." *Bioresource Technology*, 102, 8344-8349.